

DIOGO CORREA MALDONADO

**INFLUÊNCIA DA IMOBILIZAÇÃO DO JOELHO
NA CARTILAGEM ARTICULAR DO FÊMUR DE RATOS WISTAR
EXERCITADOS E NÃO EXERCITADOS: ESTUDO
MORFOMÉTRICO E
ESTEREOLÓGICO**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências**

SÃO PAULO

2013

Diogo Correa Maldonado

**INFLUÊNCIA DA IMOBILIZAÇÃO DO JOELHO
NA CARTILAGEM ARTICULAR DO FÊMUR DE RATOS WISTAR
EXERCITADOS E NÃO EXERCITADOS: ESTUDO
MORFOMÉTRICO E
ESTEREOLÓGICO**

**Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina,
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências pelo programa de Pós- Graduação
em Biologia Estrutural e Funcional**

**Orientador: Dr. Marcelo Cavenaghi Pereira da
Silva**

SÃO PAULO

2013

Maldonado, Diogo Correa

Influência da imobilização do joelho na cartilagem articular do fêmur de ratos Wistar exercitados e não exercitados. Estudo morfométrico e estereológico. / Diogo Correa Maldonado. - -

São Paulo, 2013.

XV, 58f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Biologia estrutural e funcional.

Título em inglês: Influences of immobilization of the knee articular cartilage of the femur from Wistar rats exercised and not exercised. Morphometric and stereological study.

1. Imobilização do joelho. 2. Cartilagem articular. 3. Exercício físico. 4. Morfometria. 5. Estereologia. 6. Ratos Wistar

São Paulo, 17 de dezembro de 2010.
CEP 1733/10

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) DIOGO CORREA MALDONADO

Co-Investigadores: Marcelo Cavenaghi Pereira da Silva (orientador)

Disciplina/Departamento: Anatomia Descritiva e Topográfica da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: FAPESP.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **“Efeitos da imobilização do joelho na cartilagem articular do fêmur de ratos Wistar treinados e não treinados. estudo morfométrico, estereológico e imunohistoquímico”.**

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria B - estudo crônico.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica.

OBJETIVOS: Avaliar os efeitos da imobilização do joelho na cartilagem articular dos côndilos femorais de animais treinados e não treinados..

RESUMO: Estudo com 44 ratos machos, Wistar, com 6 meses. Anestésico: ketamina e diazepam. Eutanásia: pentobarbital sódico. Serão constituídos 4 grupos: Grupo controle - 11 animais, sem exercício, sem imobilização; Grupo exercitado - 11 animais, com corrida em esteira, sem imobilização; grupo com imobilização -11 animais, sem exercício, com imobilização; grupo com exercício e com imobilização - 11 animais que farão exercício e serão imobilizados. Os animais realizarão testes de esforço máximo (TEM) para determinar a velocidade a ser empregada no treinamento. Os animais dos grupos GC e GI serão submetidos à atividade física na esteira apenas uma vez por semana durante 10 minutos com velocidade igual a 30% do respectivo teste de esforço máximo, apenas para manterem a habilidade de correr na esteira. Os animais dos grupos Gex e GExI serão submetidos a exercício físico regular cinco vezes por semana em esteira ergométrica por um período de oito semanas. Após a última sessão de corrida, os animais dos grupos GI e GExI serão pesados e seus membros inferiores direitos serão imobilizados em 90° flexão na articulação do quadril e joelho e em posição neutra de tornozelo por meio de aparelho de gesso com ataduras colocadas até o tronco para restringir os movimentos do joelho. Estes animais permanecerão com os membros imobilizados por dois meses. Os animais serão eutanasiados por decapitação e as articulações dos joelhos direitos removidas, examinando-se as epífises distais do fêmur. Os côndilos femorais contendo as cartilagens articulares serão fixadas em solução de formaldeído e processadas para avaliação histológica. Serão realizadas colorações por HE, picrossirius e alcian blue. Será realizada análise histomorfométrica e estereológica da cartilagem.

Serão realizadas reações imunoistoquímicas para colágeno II e IV, fibronectina, osteopontina, osteocalcina e osteonectina. Serão realizadas análises em microscopia eletrônica de transmissão e de varredura..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: A imobilização de uma determinada articulação, por um certo tempo, é um procedimento terapêutico benéfico para a articulação. Entretanto, esse procedimento pode produzir também efeitos indesejáveis na cartilagem articular, tais como ulcerações no tecido cartilágneo, devido a alterações provocadas nesse tecido, como perda de proteoglicanas, de massa e volume totais da cartilagem. O conhecimento das inter-relações entre movimentos articulares ou falta de movimentos e atrofia da cartilagem é fundamental para o desenvolvimento de estratégias que visam prevenir e tratar doenças articulares..

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos do estudo.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: FAPESP - R\$ 12500,00.

CRONOGRAMA: Adequado.


OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 12/12/2011 e 11/12/2012.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,



Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

1733/10

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
UNIFESP
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA HUMANA E GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
ESTRUTURAL E FUNCIONAL

Chefe do Departamento: Profa. Dra. Sima Godosevicius

Coordenadora do curso de Pós-graduação: Profa. Dra. Janete Maria Cerutti

DIOGO CORREA MALDONADO

**INFLUÊNCIA DA IMOBILIZAÇÃO DO JOELHO
NA CARTILAGEM ARTICULAR DO FÊMUR DE RATOS WISTAR
EXERCITADOS E NÃO EXERCITADOS: ESTUDO
MORFOMÉTRICO E
ESTEREOLÓGICO**

Presidente da Banca:

Prof. _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. _____

Prof. _____

“A Anatomia nunca foi e jamais será o ramo seco da Biologia”.

Alfonso Bovero

DEDICATÓRIA

A quem criou esse universo maravilhoso...

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Pedro Batista Maldonado, *in memoriam*

Seus ensinamentos permanecem vivos em meu íntimo.

Mesmo ausente materialmente, sei que em todas as
minhas conquistas o senhor se orgulha e se alegra, onde
quer que esteja.

DEDICATÓRIA

A minha mãe Maria Helena Correa,
Muito obrigado pela educação, carinho, paciência e amor. Devo tudo à
senhora, tudo o que eu fizer nessa vida ou em outra não
será o bastante para lhe agradecer.

DEDICATÓRIA

A minha noiva Mônica,

Meu amor serei eternamente grato a quem me proporcionou te encontrar nessa vida. O que sinto por ti é o mais puro sentimento que já senti. Muito obrigado por estar sempre ao meu lado, me apoiando em todas as situações.

Te amo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Cavenagui Pereira da Silva, pela confiança, oportunidade e aprendizado durante a realização de mais uma etapa em minha vida. Muito obrigado professor.

Ao Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza, por seus ensinamentos e por ser um dos meus maiores incentivadores à pesquisa. Sua dedicação é louvável, professor. Que eu possa ter o privilégio de continuar desfrutando de sua companhia por muitos anos dessa vida.

Aos professores Fabio César Prosdócimi e Sidney Mamoru Keira, com quem dei meus primeiros passos nas ciências anatômicas.

Aos professores José Manuel de Almeida Júnior e Nilton Amato Jr, meus grandes incentivadores à docência e a dedicação ao estudo da Anatomia Humana.

Ao Prof. Dr. Renato Nogueira Ribeiro Ferraz, outro grande incentivador à pesquisa científica.

Aos amigos e professores Juliano Pereira, Marcelo Calderon, Fabio Martinez, Eduardo Beber e Guilherme Cotomacci, com quem discuti, discuto e aprendo quase que diariamente Anatomia Humana.

Ao meu amigo Paulo Fritoli, quem me orientou na primeira dissecação cadavérica, e a quem tive o privilégio de conviver durante anos de laboratório.

Aos técnicos de laboratório de Anatomia Humana com dissequei por pelo menos seis anos de minha vida, aprendi muito com todos vocês, obrigado.

Aos meus mestres, por me darem a oportunidade de adquirir conhecimento.

Aos meus alunos, que me incentivam a estudar cada vez mais.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	vi
Agradecimento.....	x
Listas.....	xii
Resumo.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos.....	3
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3. MÉTODOS.....	11
3.1 Animais.....	11
3.2 Protocolo de exercício dos animais.....	12
3.3 Preparação do material.....	12
3.4 Coloração dos cortes para análise quantitativa.....	13
3.5 Análise quantitativa da cartilagem.....	14
3.6 Análise estatística.....	19
4. RESULTADOS	20
5. DISCUSSÃO.....	34
6. CONCLUSÕES.....	38
7. ANEXOS.....	39
8. REFERÊNCIAS.....	49
Abstract	

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema demonstrando as quatro camadas da cartilagem articular, suas porcentagens de ocupação na cartilagem articular e o “Tide Mark” ou linha de maré importante local de transição entre duas das quatro camadas.....4
- Figura 2** – Fotomicrografia demonstrando o método de análise quantitativa da espessura das camadas da cartilagem articular do fêmur.....13
- Figura 3** – Fotomicrografia demonstrando o método de análise quantitativa dos núcleos dos condrócitos.....15
- Figura 4** – Fotomicrografia demonstrando o método de análise para mensuração do volume nuclear médio dos condrócitos da camada média.....16
- Figura 5** - Fotomicrografia mostrando o método de contagem imparcial utilizando lente polarizada e frame com 100 pontos, distribuídos de forma equidistantes sobrepostos à cartilagem articular do côndilo femoral medial.....17
- Figura 6** – Fotomicrografia de secções da cartilagem articular do côndilo femoral medial corados por HE, utilizadas para mensurar as espessuras das camadas da cartilagem, espessura total da cartilagem e quantificação dos condrócitos.....19
- Figura 7** – Fotomicrografia de secções da cartilagem articular do côndilo femoral medial corados por HE mostrando os núcleos dos condrócitos com seus diâmetros maiores e menores nos diferentes grupos: GC, GI, GE e GExl.....20
- Figura 8** – Gráfico mostrando os pesos médios dos animais dos 4 grupos estudados no 1º e no 2º tempo de esforço máximo.....21

Figura 9 – Gráfico mostrando as velocidades médias obtidas pelos animais dos quatro grupos estudados, no 1º e no 2º tempo de esforço máximo.....	22
Figura 10 – Efeitos da imobilização sob a espessura total da cartilagem articular.....	23
Figura 11 – Efeitos da imobilização sob a espessura da camada superficial da cartilagem articular.....	24
Figura 12 – Efeitos da imobilização sob a espessura da camada média da cartilagem articular.....	25
Figura 13 – Efeitos da imobilização sob a espessura da camada profunda da cartilagem articular.....	26
Figura 14 – Efeitos da imobilização sob a densidade numérica dos condrócitos da cartilagem articular.....	27
Figura 15 – Efeitos da imobilização sob o volume nuclear dos condrócitos da cartilagem articular.....	28
Figura 16 – Efeitos da imobilização sob a densidade de volume das fibras colágenas da cartilagem articular.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CS	Camada superficial
CM	Camada média
CP	Camada Profunda
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GAGs	Glicosaminoglicanas
GC	Grupo Controle
GI	Grupo Imobilizado
GEx	Grupo Exercitado
GExI	Grupo Exercitado e imobilizado
HE	Hematoxilina-eosina
MEC	Matriz extracelular
PGs	Proteoglicanas
TEM	Teste de esforço máximo
TEMs	Testes de esforço máximo
x	Veze
μm	Micrômetros
μm^3	Micrômetros cúbicos

RESUMO

Sabe-se que a imobilização de qualquer articulação sinovial promove diversos efeitos deletérios nos seus diferentes componentes, principalmente na cartilagem articular. O exercício físico é um dos grandes aliados para o combate de patologias ou situações que degeneram a cartilagem articular. Vários estudos apontam os efeitos benéficos do exercício físico e maléficos da imobilização articular, porém não existem estudos demonstrando os efeitos da imobilização em animais ou humanos previamente exercitados. **Objetivo:** avaliar se o processo degenerativo da cartilagem articular que acompanha a imobilização articular é minimizada em praticantes de exercício físico. **Métodos:** Foram analisadas, através de microscopia de luz, a morfologia das camadas e de seus componentes, as espessuras das camadas articulares, a espessura total da cartilagem, a densidade numérica de condrócitos, o volume dos núcleos dos condrócitos (camada média) e a densidade de fibras colágenas (camada média) da cartilagem articular no côndilo femoral medial de ratos Wistar. Quatro grupos foram utilizados: grupo controle (GC), grupo imobilizado (GI), grupo exercitado (GEx) e grupo exercitado e imobilizado (GExI). As articulações dos joelhos direitos dos GI e GExI foram imobilizadas a 90° utilizando tala gessada, durante 8 semanas. Os grupos GEx e GExI foram submetidos a exercício em esteira durante 8 semanas. **Resultados:** Nos animais sedentários, a imobilização do joelho promoveu efeitos deletérios na cartilagem articular. Nesses animais, ocorreu diminuição: da espessura da cartilagem como um todo e de cada uma das suas camadas, da densidade de fibras colágenas, da densidade numérica dos condrócitos, do volume dos núcleos dos condrócitos. Estes efeitos foram todos, e em diferentes proporções atenuados nos animais previamente exercitados. **Conclusão:** O exercício promove alterações benéficas na cartilagem articular, de tal maneira que, se a articulação tiver que ser imobilizada, ocorrerá efeitos deletérios pouco importantes na cartilagem articular.

Palavras-chaves: Cartilagem articular, joelho, imobilização, exercícios aeróbios.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as diversas articulações do corpo humano, as sinoviais são as mais abundantes. Apresentam alta complexidade, estrutural e de movimento, sendo projetadas basicamente para mobilidade e estabilidade (NORKIM, 2001). Assim sendo, podemos inferir que o movimento é benéfico e a ausência de movimento é maléfica para as articulações sinoviais.

Dentre os componentes das articulações sinoviais destacam-se as cartilagens articulares que recobrem o tecido ósseo na articulação. A importância do conhecimento estrutural da cartilagem articular é essencial para a compreensão de doenças degenerativas, como a osteoartrose que leva a imobilização do paciente, dificultando a realização de suas atividades normais. As doenças degenerativas promovem destruição da cartilagem articular (CURRIER; NELSON, 1992).

A cartilagem articular é constituída por células denominadas condrócitos, que são responsáveis pela síntese e manutenção dos componentes orgânicos da matriz extracelular (MEC) (BONASSAR et al., 1995). O componente orgânico extracelular é composto por fibrilas colágenas, principalmente do tipo II, inseridas em uma solução que contém proteoglicanas (PGs) e glicosaminoglicanas (GAGs) (SMITH et al., 2000). Nos trabalhos de HAAPALA et al., (2001) ficou demonstrado que são as PGs e GAGs, que primeiramente sofrem alterações nas doenças degenerativas da cartilagem articular. As PGs são responsáveis pela retenção de água, proporcionando maior resistência às cargas compressivas e deformação elástica da cartilagem (SMITH et al., 2000). A estrutura e interação química das GAGs influenciam as propriedades e conformação dos agregados de PGs. Processos degenerativos, como a osteoartrose frequentemente levam a imobilização das articulações com prejuízo para os seus componentes, especialmente as cartilagens articulares. Como são os condrócitos que produzem e mantêm os componentes das cartilagens articulares, alterações nestas células influenciam a estrutura da cartilagem.

Muitas vezes é necessário imobilizar a articulação, em casos de fraturas, por exemplo, para a recuperação do tecido ósseo. Entretanto, a imobilização das

articulações sinoviais nestes casos de recuperação de traumas, é maléfica para a cartilagem articular (REZENDE et al., 2000).

A ausência de mobilidade causa diversos efeitos deletérios à cartilagem articular, dentre eles, a diminuição da espessura da cartilagem articular, GAGs, aumento de água (PALMOSKI et al., 1980), diminuição das PGs (JORTIKKA et al., 1997) e alterações em suas propriedades mecânicas (USUBA et al., 1998).

O exercício físico é uma das modalidades terapêuticas mais recomendadas para indivíduos com danos à cartilagem articular (ZHANG et al., 2008), pois estudos demonstram que o treinamento físico tem potencial para reduzir a progressão de patologias como a osteoartrite (LANGE et al., 2008). O exercício fortalece a cartilagem entre outros motivos porque promove aumento de síntese dos componentes que compõe a cartilagem articular (GALOIS et al., 2004).

Vários trabalhos têm sido realizados mostrando os efeitos maléficos da imobilização sobre as cartilagens articulares em indivíduos sedentários. Porém, não foram encontradas na literatura consultada informações sobre os efeitos da imobilização da articulação em cartilagens articulares em praticantes de exercício físico.

1. 1.Objetivos

Objetivos gerais

Avaliar os efeitos da imobilização do joelho na região central da cartilagem articular dos côndilos femorais mediais em animais exercitados e não exercitados.

Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da imobilização do joelho nos seguintes parâmetros da região central da cartilagem articular dos côndilos femorais mediais em animais exercitados e não exercitados:

- 1- Espessura de cada camada e espessura total da cartilagem articular do fêmur.
- 2- Densidade numérica (número por campo) dos núcleos de condrócitos de cada camada da cartilagem
- 3- Volume nuclear médio dos condrócitos da camada média da cartilagem
- 4- Densidade de volume (área ocupada) das fibras colágenas da camada média da cartilagem.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Camadas das cartilagens articulares e características dos condrócitos

A cartilagem articular é um tipo de tecido conjuntivo especializado que recobre as extremidades dos ossos nas articulações sinoviais (NEERU, MADHUR, 2012). Caracteriza-se por ser um tecido hipocelular e ter uma remodelação considerada lenta sendo esse tecido aneural e avascular (GOLDRING 2000; AIGNER, 2006). As cartilagens articulares são constituídas por um componente celular esparsos, os condrócitos e por uma MEC rica em macromoléculas como colágeno e PGs. Ambos os componentes estão dispostos em camadas com diferentes espessuras na cartilagem (HUBER et al., 2000).

Os condrócitos estão situados em cavidades da matriz extracelular denominadas lacunas. Sob condições fisiológicas normais são responsáveis por manter a homeostase da cartilagem, através do balanço entre síntese e degradação dos componentes da MEC (ANGEL et al, 2003; ALFORD, COLE, 2005) e o aporte nutricional do tecido (FELICE et al, 2002).

Com base no arranjo dos condrócitos e do componente colágeno da matriz, quatro camadas ou zonas podem ser distinguidas em cortes perpendiculares à superfície da cartilagem: I – zona superficial; II – Zona intermediária ou média, III – zona profunda e IV – zona calcificada (TRATTINIG, 1997; HUBER et al., 2000; POOLE et al., 2001).

A zona superficial representa entre 10 a 20% da espessura total da cartilagem, na qual as fibrilas colágenas encontram-se mais ordenadas e em maior concentração em relação às outras zonas. Os condrócitos dessa região estão dispostos de forma paralela à superfície articular com morfologia ovalada, sendo de pequenas dimensões. Esta zona ajuda a reduzir a fricção entre as superfícies articulares opostas durante os movimentos (DUNHAM et al, 1988).

A zona média ou intermediária constitui aproximadamente 60% da espessura total cartilaginosa. A rede colágena desta camada difere daquela da camada superficial, pois, possui uma disposição aleatória formando uma rede de fibras frouxamente enroladas que permite a deformação e auxilia na absorção de parte das forças impostas sobre a

superfície articular. Assim como as fibras colágenas, os condrócitos também se distribuem de forma aleatória, porém possuem formato mais arredondado e dimensões maiores em relação aos da camada superficial (KUETTNER et al, 1991).

A terceira zona (camada profunda) representa cerca de 30% da espessura total da cartilagem. As fibras colágenas desta camada atravessam à interface da cartilagem desde a zona não calcificada até a região calcificada, onde se fixam firmemente (NORKIN, 2001).

A região ou zona mais profunda também denominada calcificada localiza-se adjacente ao osso subcondral e fixa intensamente a cartilagem ao início da região óssea (DUNHAM et al, 1988). A região de transição entre a zona não calcificada e calcificada é chamada de marca de maré, sendo importante devido a sua relação com o crescimento, cicatrização e envelhecimento da cartilagem (LEVANGIE, 2001) (figura 01).

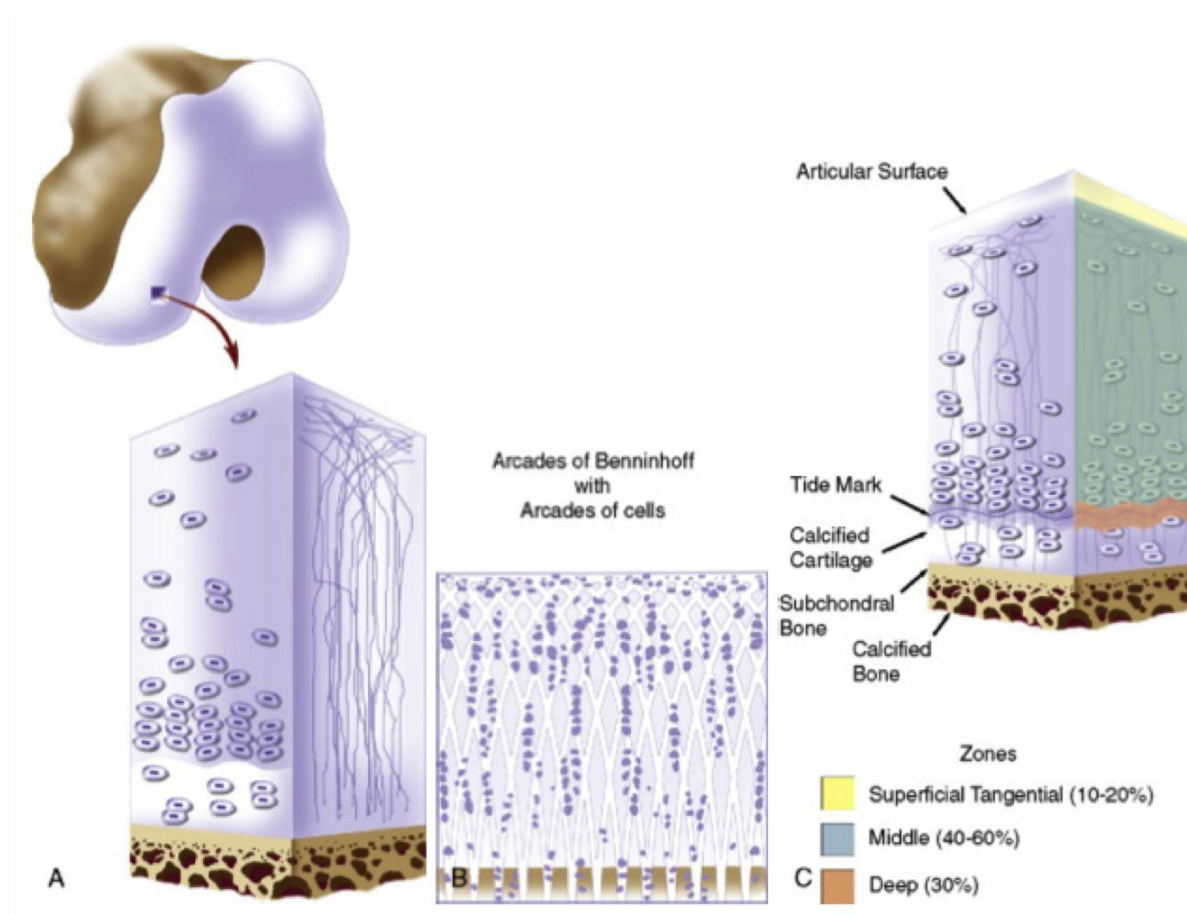


Figura 1 – Esquema demonstrando as quatro camadas da cartilagem articular, suas porcentagens de ocupação na cartilagem articular e o “Tide Mark” ou linha de maré importante local de transição entre duas das quatro camadas. Fonte: <http://tirico.com.br/cartilagem>

Para que a cartilagem possa exercer suas funções biológicas e mecânicas é necessária a integridade de seus componentes (HARDINGAM et al., 1992; HUBER et al., 2000). Modificações na concentração de qualquer um dos componentes da cartilagem podem levar ao aparecimento de lesões (VASAN, 1983). Alterações morfológicas são influenciadas pelas adaptações do tecido às demandas funcionais de redistribuição e absorção de forças compressivas (VANWANSEEELE et al., 2002). A integridade do tecido cartilaginoso é totalmente dependente das influências sofridas pela MEC e a resposta dos condrócitos sob a aplicação de cargas (ISHIGURO et al., 2002). A aplicação de sobrecarga na cartilagem articular leva a processo degenerativo (ROSS, 2005).

Por esse motivo, alterações são observadas na cartilagem articular quando há sobrecarga ou imobilização (LEROUX et al., 2001) sendo a diminuição da espessura das camadas articulares o efeito deletério mais precocemente visualizado. Cartilagens articulares com menor espessura de suas camadas refletem na menor capacidade de absorção de cargas na articulação. Essas alterações são, ao menos parcialmente, reversíveis para valores normais após a remobilização (NARMONEVA et al., 2002).

2.2 – Colágeno e PGS da ME

Na matriz, o colágeno é representado principalmente por fibrilas colágenas delgadas do tipo II, intimamente associadas às moléculas de PGs e uma grande quantidade de água (MARTEL-PELLETIER et al., 2005). Além das fibras colágenas do tipo II, são encontrados diversos outros tipos de moléculas, como fibrilas do tipo IX e XI (EYRE et al., 2002).

As PGs são moléculas constituídas por cadeias de GAGs ligadas a um esqueleto proteico. São encontrados diversos tipos de PGs na cartilagem (decorina, biglican, perlecan e versican), mas é o agrecan a principal proteoglicana presente na cartilagem articular (NISHIMURA et al., 1996). As principais proteoglicanas encontradas na cartilagem são as GAGs condroitim sulfato e queratam sulfato (MICHELLACCI, 1996; GOMES, 2001). Além de sua importância na constituição da estrutura da cartilagem articular, a MEC, apresenta um papel funcional importante já que seus elementos como a integrina CD-44 e anexinas interagem com a superfície dos condrócitos, realizando uma interação célula-matriz, importante nos mecanismos de mecanotransdução da cartilagem articular e homeostasia do tecido (GOLDRING, 2005). A resistência que as cartilagens articulares

possuem para forças compressivas mecânicas, é conferida pela interação existente entre o agreca e as fibras colágenas (STEVENS, LOWE, 1997; HUBER et al, 2000).

2.3 – Efeitos do Exercício Físico sobre as cartilagens articulares

Dentre os inúmeros benefícios que a prática de exercícios físicos promove, destacam-se a proteção da capacidade funcional e da aptidão física, além de menor risco de desenvolver doenças ou condições crônicas degenerativas (NAHAS, 2001). Os benefícios desempenhados pelo exercício físico para as estruturas corporais vêm sendo apontado por diversos autores durante anos (VAN DEN HOOGEN et al, 1998; HAAPALA et al, 1999; JONES et al, 2000). Numerosas pesquisas envolvendo doenças assim como situações que promovem degeneração da cartilagem articular vem sendo realizadas (MINOR, 2004; SHRIER, 2004) sendo o exercício físico um dos principais métodos de tratamento para as alterações deletérias das cartilagens articulares. Nos trabalhos de CHÁVEZ, (1998) e THORSTENSSON, (2005) é enfatizado que o exercício é considerado um dos mais importantes tratamentos para pacientes com osteoartrite leve a moderada e que níveis moderados de exercício físico não está relacionados com a progressão radiográfica da osteoartrite. A realização de exercício físico tem se mostrado benéfica para a cartilagem articular em diversos aspectos, preservando sua morfologia normal ou próxima do normal, tanto em animais jovens como em idosos (HULDELMAIER et al., 2001). Exercícios realizados com cargas adequadas em animais jovens produzem uma melhora no padrão de desenvolvimento da cartilagem e, em animais adultos, contribui para a conservação da MEC da cartilagem. A redução do estresse e da tensão, tal como ocorre na imobilização da articulação, diminui a organização da matriz cartilágnea e a função de síntese celular, enquanto que o aumento destas forças, como ocorre nos exercícios, leva ao aumento das suas funções (SAAMAMEN et al., 1994). No trabalho de Buckwalter (1993), verificou-se que mesmo após o estresse articular realizado por exercícios prolongados, não houve consequências adversas que promovessem doenças degenerativas articulares. Para autores como KIVIRANTA et al., (1987), KIVIRANTA et al., (1998) e OTTERNESS et al., (1998) o exercício físico melhora as propriedades biológicas e biomecânicas das cartilagens articulares, tendo efeito condroprotetor, já que, favorece a síntese de proteoglicanas, melhora a adaptação aos esforços além de estimular os condrócitos a produzir todos os elementos que compõe a MEC. No trabalho de Otterness et al., (1998), foi demonstrado que o exercício moderado mantém o conteúdo de PGs da

MEC em animais jovens enquanto que a falta do exercício pode acarretar na diminuição destes elementos. Nos trabalhos de GALOIS et al., (2004) e APLETON et al., (2007) foi demonstrado que o exercício físico realizado de forma controlada exerce influência positiva na progressão da osteoartrite, enquanto que exercícios com alta intensidade aceleram o processo degenerativo da cartilagem. Resultados semelhantes são apontados nos trabalhos de HURLEY, SCOTT., (1998), PETRELLA, BARTHA., (2000) e HURLEY, ECKSTEIN (2009). A presença de cargas constantes é importante para a manutenção da saúde da cartilagem (HALL et al., 1991, KIM et al., 1994). As cargas impostas sobre a cartilagem têm grande influência na organização fisiológica dos constituintes da MEC (HYTTINEM et al., 2001).

Entretanto, deve-se salientar que exercícios realizados acima do limite normal de carga e intensidade causam malefícios à saúde da cartilagem articular (MAFFULLI, 1992).

Dentre as alterações maléficas MAFFULLI, (1992) e LEANNE et al., (1999) apontam que a mais evidente é a degeneração da cartilagem articular, causada inicialmente pelo efeito do estresse repetitivo sobre as fibras colágenas e PGs da MEC, levando-as à falência (ANDERSON, 1962). Após analisar animais adultos jovens AROSKI et al., (1993) relataram que o exercício físico exacerbado causou desagregação da cartilagem articular com diminuição do teor das PGs na cartilagem. Em trabalho semelhante BUCKWALTER, (1995) apontou que no exercício exagerado ocorre aumento do fluxo de água, levando a ruptura da MEC, o que diminui a integridade e aumenta a susceptibilidade da cartilagem às alterações degenerativas. A diminuição das PGs durante o exercício exagerado é causada pelo aumento da produção e da atividade de enzimas que as degradam, levando subsequentemente à diminuição dos componentes da MEC (PAP et al., 1998)

2.4- Efeitos da imobilização das articulações sobre as cartilagens articulares

A imobilização é um método frequentemente utilizado como terapia de recuperação para acometimentos músculo-esqueléticos desde a época de Hipócrates (APPEL, 1986).

Utiliza-se a imobilização de uma determinada articulação, por um certo tempo como um procedimento terapêutico para a articulação (PATRIDGE, DUTHIE, 1983) porque a limitação dos movimentos articulares permite sua recuperação (GAULT, SPYKER, 1969).

As causas da imobilização articular podem ser as mais variadas, sendo mais utilizadas quando há fraturas, doenças reumáticas e luxações (CAMANHO, 2001).

Entretanto, esse procedimento produz também efeitos indesejáveis na cartilagem articular, sob o ponto de vista funcional e morfológico, tais como alterações da cápsula articular levando a limitação da amplitude de movimento (REZENDE, 2000) assim como ulcerações no tecido cartilagíneo, devido a modificações provocadas nesse tecido, como perda de PGs, de massa e volume totais da cartilagem (FRATECHI, 2002).

O conhecimento das inter-relações entre movimentos articulares ou falta de movimentos e atrofia da cartilagem é fundamental para o desenvolvimento de estratégias que visam prevenir e tratar doenças articulares (VANWANSEEELE et al., 2002).

Do ponto de vista histológico, as mudanças que ocorrem na cartilagem articular após a imobilização da articulação sinovial normal são progressivas e incluem proliferação do tecido conjuntivo, aderência da superfície articular, necrose e ulceração da cartilagem e alterações do osso subcondral (THAXTER et al., 1965). De acordo com Brandt (2003), a imobilização prolongada de uma articulação sinovial resulta em perda de macromoléculas estruturais da matriz. Porém, se a imobilização for interrompida, os condrócitos voltam a sintetizar as macromoléculas com suficiente rapidez, e a cartilagem poderá ser sintetizada com êxito, tornando as alterações reversíveis. No trabalho de Del Carlo et al.,(2007) a imobilização da articulação do joelho de ratos por 45 dias afetou a marcha e a amplitude articular. As realizações tanto do exercício livre quanto do orientado influenciaram positivamente no retorno às condições fisiológicas articulares determinando o aumento do número de condrócitos, aumento da espessura da cartilagem calcificada, desaparecimento das irregularidades da superfície articular, proliferação de tecido conjuntivo no espaço intra-articular e aumento da espessura do osso subcondral. Nos animais que haviam sido

imobilizados e, que depois, foram submetidos ao exercício de natação, ocorreu menor número de alterações tanto na cartilagem articular quanto no osso subcondral, quando comparados com os animais que foram imobilizados e mantidos somente com atividade livre, mas sem exercícios.

Após a imobilização da articulação de ratos, observou-se que as mudanças mais precoces e severas acontecem nas áreas de contato entre superfícies articulares, resultando em rápido início de necrose. As alterações ocorrem tanto por ação da compressão mecânica quanto pela imobilização propriamente dita, por impedir a difusão de nutrientes do líquido sinovial para a cartilagem comprimida. A ausência de movimento articular e conseqüente falta de bombeamento do líquido sinovial pode também impedir a difusão do fluido sinovial (ROY, 1970). Até mesmo durante o desenvolvimento, a quantidade de movimento articular é um fator relevante para a condrogênese na cartilagem (ELDER et al, 2000).

Diversos outros tipos de alterações têm sido descritas nas cartilagens articulares após imobilização da articulação: aumento da hidratação (BRANDT, 1981; BEHRENS et al., 1989; MULLER et al., 1994; FU et al., 1998), diminuição do conteúdo de PGs (PALMOSKI et al., 1980; PALMOSKI et al., 1981; PAULKKONEN et al., 1986; KIVIRANTA et al., 1987; SAAMANEN et al., 1987; JORTIKKA et al., 1997), aumento da síntese de colágeno (VIDEMAN et al., 1981) e ossificação endocondral (ROOIJ et al, 2001).

Histologicamente observam-se: diminuição da intensidade de coloração das PGs (KIVIRANTA et al., 1987; HAAPALA et al., 1999) e diminuição da espessura da cartilagem (PALMOSKI et al 1981; JURVELIN et al., 1986; HAAPALA et al., 1999). Além disso, estudos recentes mostraram que a elasticidade da cápsula articular de joelhos de ratos imobilizados aumentou após 8 a 16 semanas de imobilização (HAGIWARA et al., 2009). Entretanto, os efeitos da imobilização podem ser diferentes dependendo do método de imobilização, das cargas utilizadas e das condições a que as cartilagens forem submetidas (JURVELIN et al., 1986).

2. MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 24 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) machos, da linhagem Wistar, adultos jovens com 3 meses de vida, confinados em gaiolas plásticas, mantidos em regime de alimentação com água filtrada e ração *ad libitum*, em temperatura ambiente e iluminação por um período de 12 horas por dia (7:00 às 19:00 horas). Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos:

- Grupo Controle (GC) – 6 animais, que não realizaram exercício, e não sofreram imobilização;

- Grupo Exercitado (GEx) – 6 animais, que realizaram exercício, no 5º e 6º mês de vida e não sofreram imobilização;

- Grupo com Imobilização (GI) – 6 animais, que não realizaram exercício e sofreram imobilização no 5º e 6º mês de vida;

- Grupo com Exercício e com Imobilização (GExI) – 6 animais que fizeram exercício no 3º e 4º mês de vida e depois foram imobilizados por 2 meses, no 5º e 6º mês de vida.

Todos os animais dos 4 grupos foram sacrificados ao final do sexto mês de vida.

3.2. Protocolo de exercício dos animais

Os animais foram submetidos à adaptação ao exercício físico após serem separados nos grupos de forma homogênea (DISHMAN et al., 1988). Após esse período os animais realizaram os testes de esforço máximo (TEM) para determinar a velocidade a ser empregada no treinamento. Um TEM foi realizado no início do experimento em uma esteira elétrica da marca INBRASPORT, totalmente adaptada aos animais, a uma velocidade de 0,3 Km/h. A cada quatro minutos a velocidade da esteira foi aumentada na mesma proporção de 0,3 Km/h. O valor do TEM foi obtido quando o animal demonstrou sinais de fadiga, ou seja, quando ele perdeu a habilidade de acompanhar a velocidade estabelecida na esteira (SILVA et al., 1997). Ao final da quarta semana foram realizados novos TEMs, para que a velocidade do treinamento fosse ajustada para as próximas quatro semanas,

caso os animais apresentassem variações nos seus desempenhos. Ao final do experimento foram realizados novos TEMs antes do sacrifício dos animais. O protocolo do treinamento físico foi assim determinado:

- Os animais dos GC e GI foram submetidos à atividade física na esteira apenas uma vez por semana durante dez minutos com velocidade igual a 30% do respectivo TEM, apenas para sofrerem o mesmo stress dos grupos CEx e GExI.
- Os animais do grupo GEx e GExI foram submetidos a exercício físico regular cinco vezes por semana (de segunda-feira à sexta-feira) em esteira ergométrica por um período de oito semanas. Na primeira semana correram trinta minutos com velocidade progressiva até 60% daquela conseguida no TEM. A partir da segunda semana o tempo de treinamento foi gradativamente aumentado, sendo que a cada semana foram aumentados dez minutos, até atingirem o tempo de 60 minutos na quarta semana de treinamento, onde ao final da mesma, um novo TEM foi realizado para ajustar a intensidade do exercício para as próximas quatro semanas.

3.3. Preparação do material

Os animais dos grupos GI e GExI foram manipulados sob anestesia geral com injeção intraperitoneal de Ketamina (75 mg/kg de peso corpóreo) e Diazepam (5 mg/kg de peso corpóreo) (TUFFERY, 1995). Seus membros inferiores direitos foram imobilizados em 90° de flexão na articulação do quadril e joelho e em posição neutra de tornozelo por meio de aparelho de gesso com ataduras colocadas até o tronco para restringir os movimentos do joelho. O gesso foi avaliado regularmente. Estes animais permaneceram com os membros imobilizados por dois meses.

Ao final do experimento, os animais dos quatro grupos foram então eutanasiados por injeção intraperitoneal de Pentobarbital sódico (75mg/kg de peso corpóreo). Foram retiradas as articulações dos joelhos direitos de todos os animais através de secção na transição entre fêmur e tíbia-fíbula. A articulação do joelho foi dissecada, os ligamentos seccionados e a extremidade distal do fêmur contendo os côndilos femorais com suas cartilagens foi separada e isolada.

Os côndilos femorais com as cartilagens articulares foram fixados em solução de formaldeído a 10% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, durante 24 horas a 4°C. Após

lavagem, foi realizada a descalcificação das peças em solução de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) a 7% dissolvidos no mesmo tampão, durante 30 dias, a 4°C (MADDEN e HENSON, 1997). Após a descalcificação, as peças foram lavadas em água destilada, desidratadas em etanol 70%, 95% e 100%, diafanizadas em xilol e embebidas e incluídas em parafina.

3.4. Coloração dos cortes para análise quantitativa da cartilagem.

De cada uma das 6 amostras de cada grupo, foram obtidos 10 cortes não seriados com 6 micrômetros (μm) de espessura dos côndilos femorais mediais, perpendiculares à superfície da cartilagem, em micrótomo manual, de maneira que em todas as amostras pudessem ser observadas as regiões centrais da cartilagem articular do fêmur. Foram examinadas as cartilagens mediais da epífise distal do fêmur por serem locais comuns de degenerações devido às relações com a descarga do peso corporal (ADAMS, 1989; KAAB et al., 1998).

Os cortes foram coletados em lâminas histológicas e corados através dos seguintes métodos, com as seguintes finalidades:

- Hematoxilina-Eosina, para análise quantitativa dos condrócitos e da espessura das camadas da cartilagem articular (MICHALANY, 1980).
- Picrossírius Red (JUNQUEIRA et al., 1979), para análise estereológica com determinação da densidade de volume das fibras colágenas da cartilagem.

Estes dados foram obtidos utilizando os cortes histológicos não seriados descritos anteriormente, através de imagens digitalizadas de maneira semi- automática utilizando o programa de análise morfoquantitativa Axio Vision (Zeiss, Alemanha) do Laboratório de Análises Morfométricas e Imunohistoquímicas da Universidade São Judas Tadeu. O sistema de análise de imagem consiste em um microscópio Carl Zeiss, acoplado a uma microcâmera de vídeo que capta as imagens histológicas devidamente posicionadas e as transmite para um computador. Nos cortes histológicos da cartilagem foram realizadas as seguintes medidas:

1 – Espessura das camadas e espessura total da cartilagem articular; 2 – Densidade numérica dos condrócitos de cada camada e de toda a camada da cartilagem; 3 - volume nuclear dos condrócitos encontrados na camada média e 4- Densidade de volume das

fibras colágenas encontradas na camada média.

3.5. Análise quantitativa da cartilagem

1- Espessura das camadas e espessura da cartilagem articular do fêmur.

Estes parâmetros foram medidos utilizando lâminas coradas com HE, em imagens digitalizadas (com o programa de análise citado). A espessura das camadas e da cartilagem foram determinadas em cada corte em μm , com objetiva e ocular de x10 gerando um aumento de x100. A análise foi feita em 3 pontos equidistantes em cada um dos 10 cortes não seriados da articulação de cada animal, utilizando-se para os cálculos, a média dessas medidas (Fig. 2).

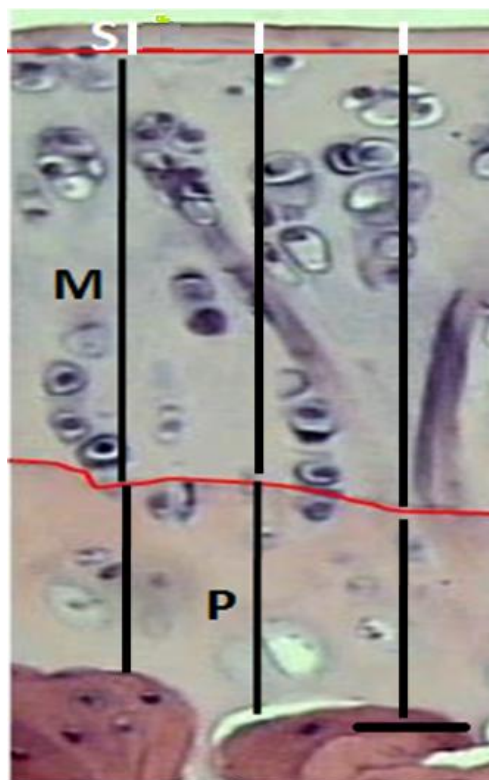


Figura 2 – Campo utilizado para a realização da medida da espessura das camadas da cartilagem articular: superficial (S), média (M) e profunda (P) em três pontos equidistantes, no côndilo femoral medial. HE. Barra: 10 μm .

Os procedimentos para determinar a espessura das camadas articulares assim como a espessura total da cartilagem foram os seguintes.

- Espessura da Camada Profunda (CP): Posicionou-se o cursor à partir do osso subcondral em sentido vertical até a região articular conhecida como marca de maré ou “tide mark”, local limitante entre a camada profunda e média.
- Espessura da Camada Média (CM): Iniciando o cursor à partir da marca de maré até o primeiro condrócito da camada superficial, que tem morfologia alongada e topografia paralela à superfície articular.
- Espessura da Camada superficial (CS): Partindo verticalmente do condrócito mais profundo da camada superficial até a superfície articular.

A espessura total da cartilagem foi obtida através da soma das medidas dos valores das 3 camadas da cartilagem.

2- Densidade numérica (número por campo) dos núcleos de condrócitos

Foi obtida através de contagem dos núcleos dos condrócitos localizados na região central do côndilo femoral medial em um campo por corte obtido aleatoriamente em 10 cortes não seriados, utilizando objetiva e ocular de x10, gerando um aumento de x100. Desta forma foram contados os núcleos presentes no campo de cada camada da cartilagem articular (superficial, média e profunda) e calculado o número total de condrócitos da cartilagem presentes no campo somando-se os núcleos de cada camada. Para a análise dessas imagens foi utilizado o programa descrito anteriormente (Fig. 3).

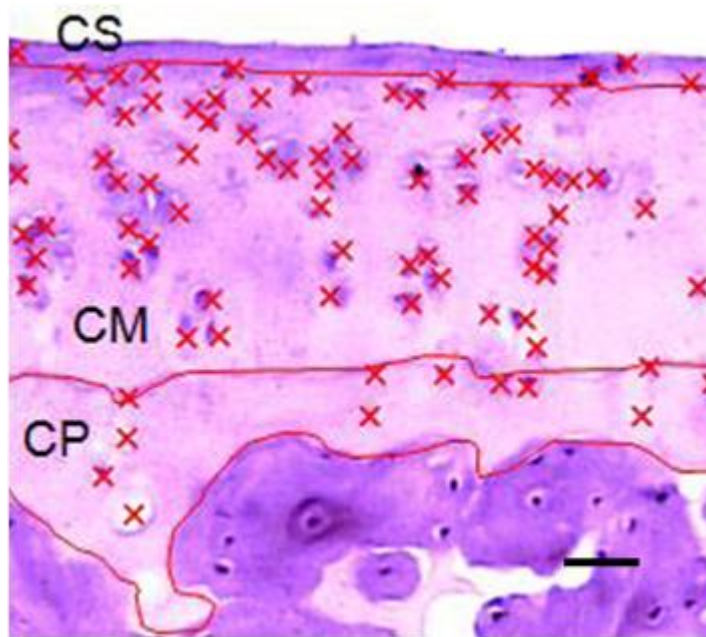


Figura 3 – Campo utilizado para a contagem do número de condrócitos por camada (densidade numérica) da cartilagem articular do fêmur. Cada condrócito do campo está marcado com x. As camadas superficial (S), média (M) e profunda (P) da cartilagem foram delimitadas por linhas vermelhas horizontais. Barra: 10 µm. Coloração: HE

3- Volume nuclear médio dos condrócitos da camada média

Foi obtido através da análise de um campo dos núcleos dos condrócitos localizados na região central do côndilo femoral medial de 10 cortes não seriados.

O Volume nuclear médio dos condrócitos, foi obtido através da medida dos diâmetros maior e menor do núcleo de cada célula presente no campo da camada média da cartilagem articular, em imagens digitalizadas (com o programa citado anteriormente) (Fig. 4). O volume nuclear foi obtido segundo a fórmula: $V = a^2 \times b / 1,91$ onde, V = volume nuclear, a = diâmetro menor do núcleo, b = diâmetro maior do núcleo e 1,91 é uma constante (SALVATORE e SCHREIDER, 1947).

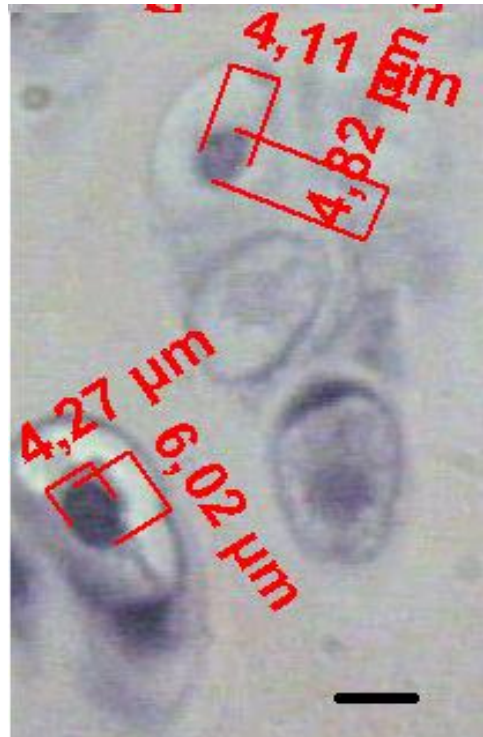


Figura 4 – Parte de campo utilizado para a obtenção do volume dos núcleos dos condrócitos em μm^3 da camada média da cartilagem articular do fêmur. A figura mostra os valores em μm dos diâmetros maior e menor de dois núcleos. Barra: 6 μm . Coloração: HE.

4- Densidade de volume das fibras colágenas ($V_{V[C]}$) da camada média da cartilagem.

Para estimar a densidade de volume de fibras colágenas, foram obtidos ao acaso dois campos da região central da cartilagem articular do côndilo femoral medial de cada corte, através do programa de análise de imagem descrito. Foram utilizados dez cortes histológicos não seriados de cada animal. Utilizou-se objetiva de x40 para esta análise, lentes de polarização e dois *frames* também conhecidos como sistemas teste, criados à partir do *software Microsoft Office PowerPoint 2007*, com 36 pontos cada um, distribuídos equidistantes uns dos outros, sendo 6 pontos na vertical e 6 na horizontal, formando uma área de 5 cm^2 cada frame (Fig. 5). O número total de pontos sobre o espaço referência, na túnica média é conhecido ($P_{[T]}=72$); de igual forma, o número total de pontos sobre as fibras colágenas($P_{[C]}$) foi registrado, contando-se os pontos que tocavam as fibras

colágenas no campo; então, a seguinte equação foi utilizada (BRÜEL, et al., 2002; WULFSOHN et al., 2004; BRÜEL, et al., 2005):

$$V_{V[C]} = \Sigma P_{[C]} / \Sigma P_{[T]}$$

Onde:

$P_{[C]}$ = número de pontos que tocam as fibras colágenas no campo da túnica média;

$P_{[T]}$ = número total de pontos na túnica media da cartilagem(72). O resultado é dado em porcentagem. Os valores variam de zero a 100% e indicam a porcentagem de ocupação do campo pelas fibras colágenas.

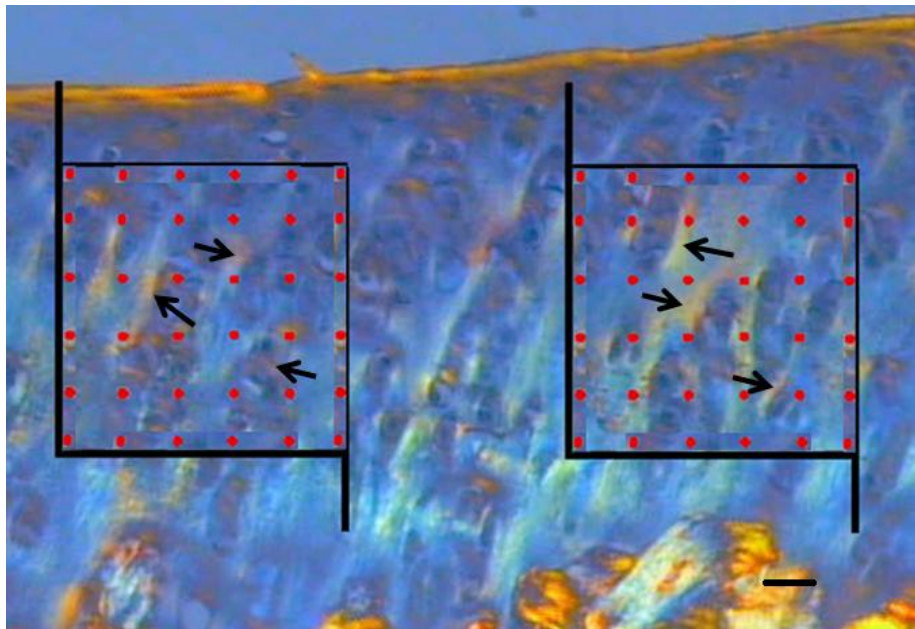


Figura 5 – Fotomicrografia mostrando dois sistemas-teste com 36 pontos cada um (em vermelho), eqüidistantes, sobrepostos a um corte da cartilagem articular do fêmur utilizado para quantificação do colágeno da cartilagem (setas pretas). Coloração pelo Picrossirius e observação à luz polarizada. Barra: 20µm.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada pelo *software* Prisma, comparando cada variável analisada entre os quatro grupos estudados. Foram calculadas as médias e desvios-padrão de cada parâmetro para cada animal. A análise de variância (*One-way* - ANOVA) foi feita sobre esses parâmetros, cuja homogeneidade atribuída à distribuição paramétrica na curva de Gauss foi testada pelo método de Kolmogorov-Smirnov. Após validada essa homogeneidade, a equivalência dos desvios-padrão foi validada pelo teste de Bartlett.

Quando confirmada a significância entre os dados das amostras ($P < 0,05$), realizou-se o teste de comparações múltiplas de Tukey *post hoc*.

Foram feitas análises do procedimento de imobilização e realização de exercício físico sob a cartilagem articular do côndilo femoral medial, sobre as espessuras das camadas e espessura total das cartilagens (μm), densidade numérica dos condrócitos de cada camada articular e de toda a cartilagem por unidade de área (*frame*), volume dos núcleos dos condrócitos da camada média (μm^3) e densidade de fibras colágenas da camada média(%).

A análise estatística dos resultados encontra-se no anexo deste trabalho

4. RESULTADOS

4.1 –Morfológicos

Aspecto histológico de cortes da cartilagem articular do fêmur após coloração (HE) dos animais de cada um dos grupos estudados. A observação desses cortes mostra os seguintes resultados: os condrócitos do GI, principalmente da camada superficial parecem estar mais pavimentosos em comparação com o GC, GEx e GExI. Observa-se também um menor diâmetro dos condrócitos da camada profunda do GI em comparação com o GC, GEx e GExI (Fig. 6).

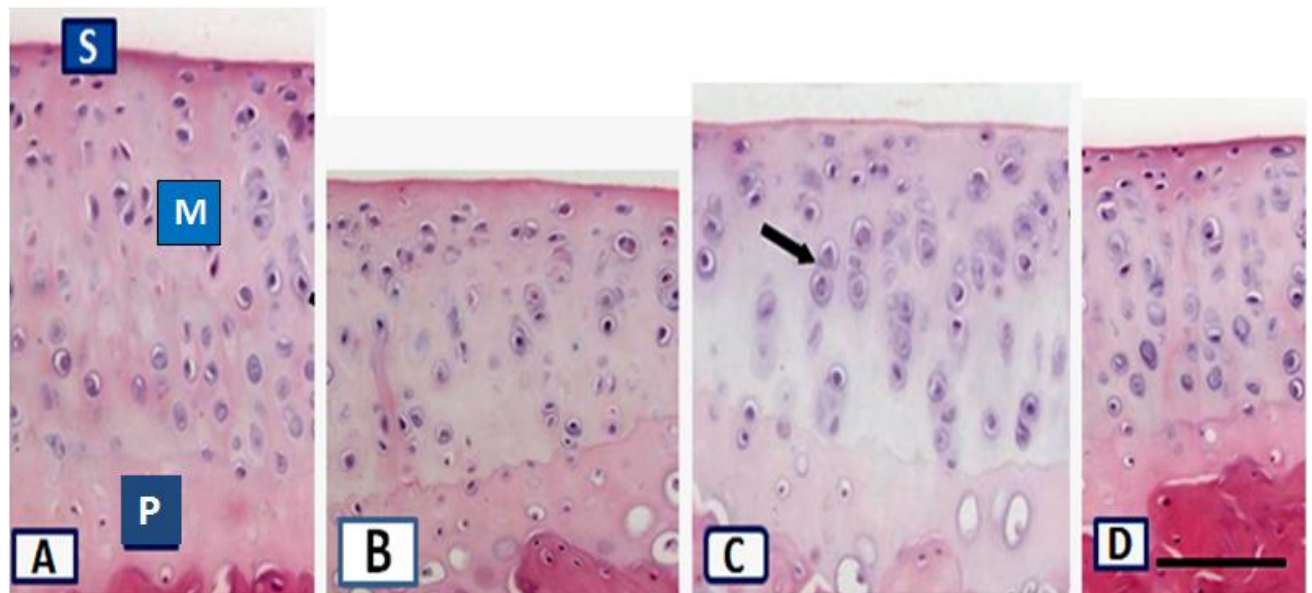


Figura 6 – Fotomicrografia de secções da região central da cartilagem articular do côndilo femoral medial corados por HE. Dois condrócitos foram apontados através de seta preta no GEx (C). Barra: 15 μ m.

Aspecto morfológico dos condrócitos nos 4 grupos estudados. O número de condrócitos e o volume dos núcleos na camada média do grupo GI aparentam ser menores do que nos demais grupos (Fig. 7).

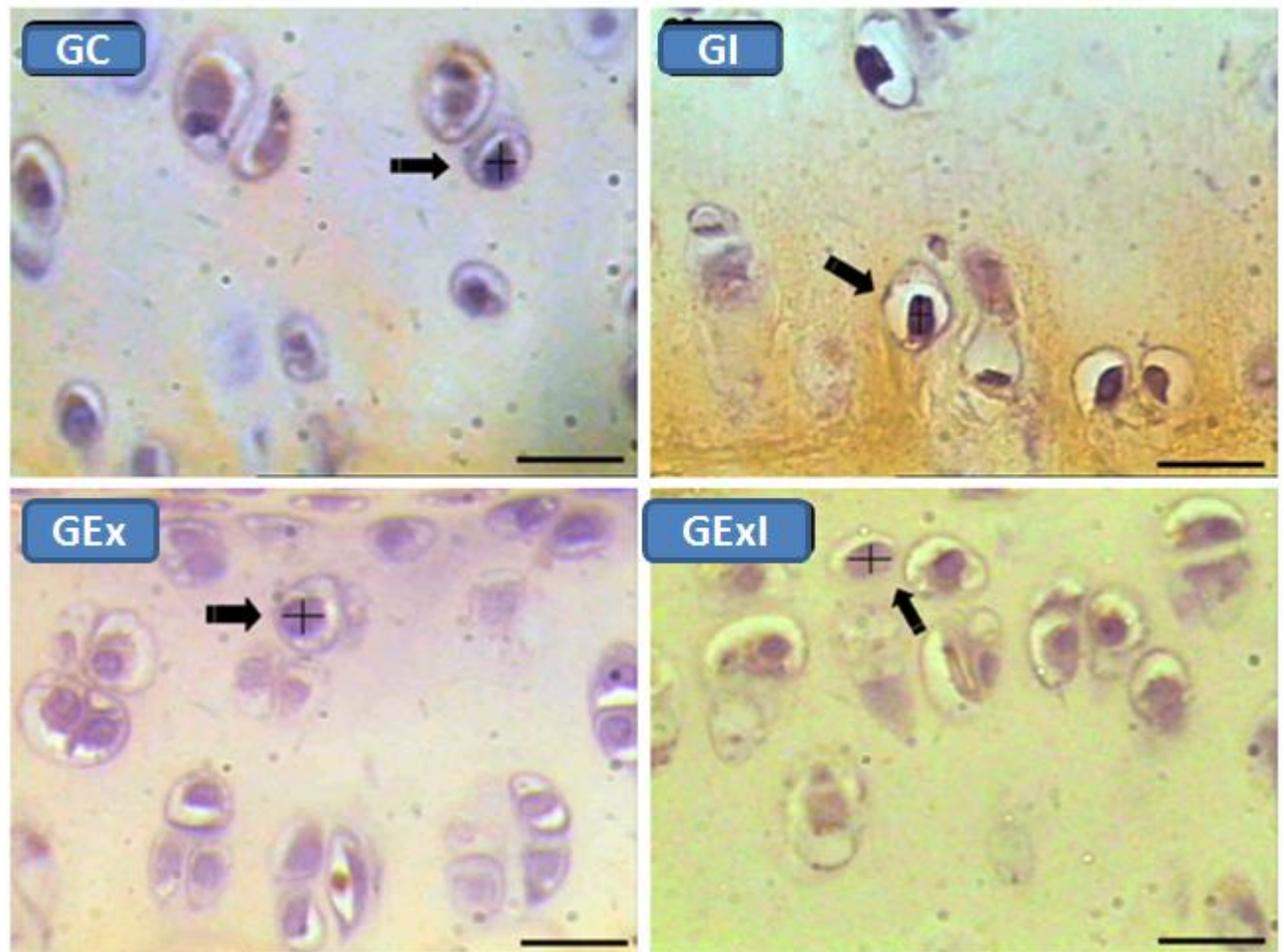


Figura 7 – Cortes histológicos da cartilagem articular do côndilo femoral medial mostrando núcleos de condrócitos (setas pretas) com seus diâmetros maiores e menores (+) nos diferentes grupos: GC, GI, GE e GExI. HE. Barras: 20 μ m.

3.2- Quantitativos

Peso dos animais

A média de pesagem obtida para os animais dos 4 grupos no primeiro TEM foi de $238,00 \pm 16,62$ g e no momento da eutanásia a média dos pesos dos grupos foi de $239,09 \pm 13,16$ para o GC, de $250,34 \pm 12,1$ para o GI, de $251,32 \pm 8,0$ para o GEx e $263,45 \pm 9,8$ para o GExI (Fig. 8). A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa entre os valores dos pesos obtidos no início e no final do experimento ($P > 0,05$).

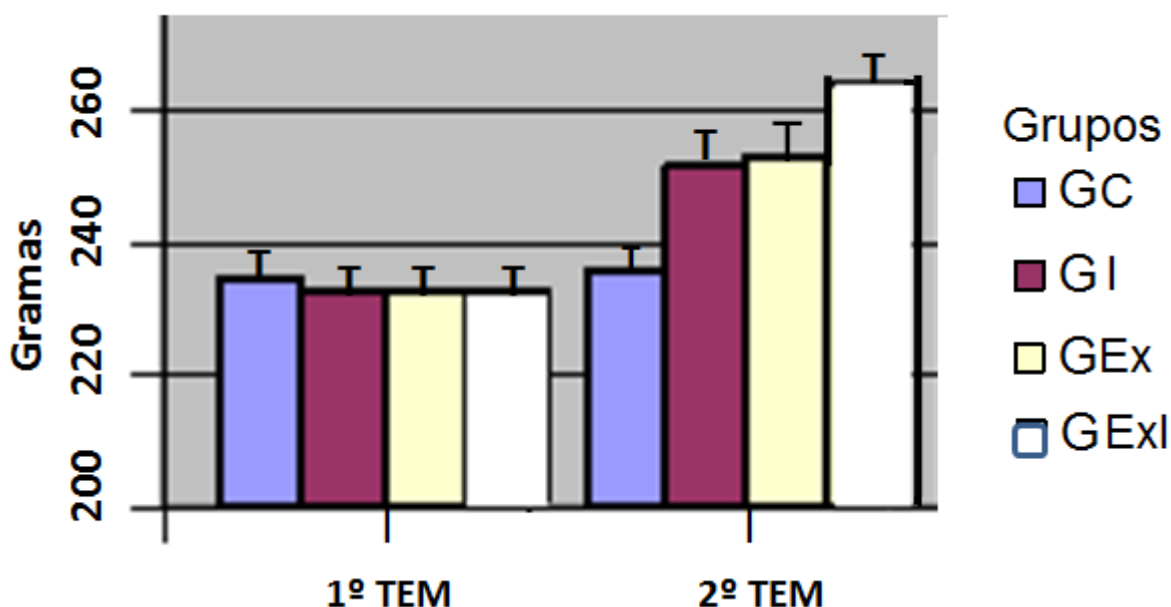


Figura 8 – Pesos médios dos animais dos 4 grupos estudados, no 1º e no 2º TEM.

Velocidades nos testes

As médias de velocidades obtidas pelos animais dos 4 grupos no primeiro TEM foi de $0,9 \pm 0,1$ Km/h, para o GC, $0,6 \pm 0,09$ Km/h, para o GI e $0,8 \pm 0,08$ para o GEX e GExI e no momento da eutanásia a média velocidades dos grupos foi de $0,9 \pm 0,1$ para o GC, de $0,78 \pm 0,2$ para o GI, de $1,3 \pm 0,08$ para o GEx e $1,05 \pm 0,09$ para o GExI (Fig. 8). A análise estatística mostrou que houve diferença significativa somente entre os valores das velocidades obtidas pelo GEx e GExI no início e no final do experimento ($P < 0,05$).

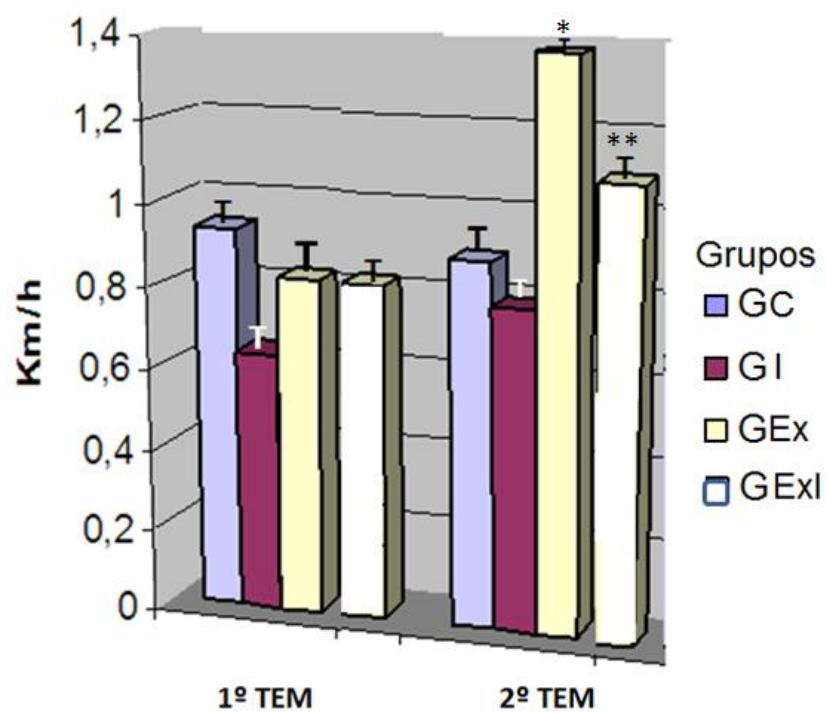


Figura 9 – Velocidade média obtidas pelos animais dos 4 grupos estudados, no 1º e no 2º TEM. *Significante vs GC, GI e GExI do 2º TEM. ** Significante vs GC e GI.

Espessura da cartilagem e de suas camadas

As médias e desvios-padrão da espessura total da região central da cartilagem articular do côndilo femoral medial nos quatro grupos estudados foram: GC (79,20±1,0), GI (40,14±2,5), GEx (77,49±1,4) e GExI (58±1,0).

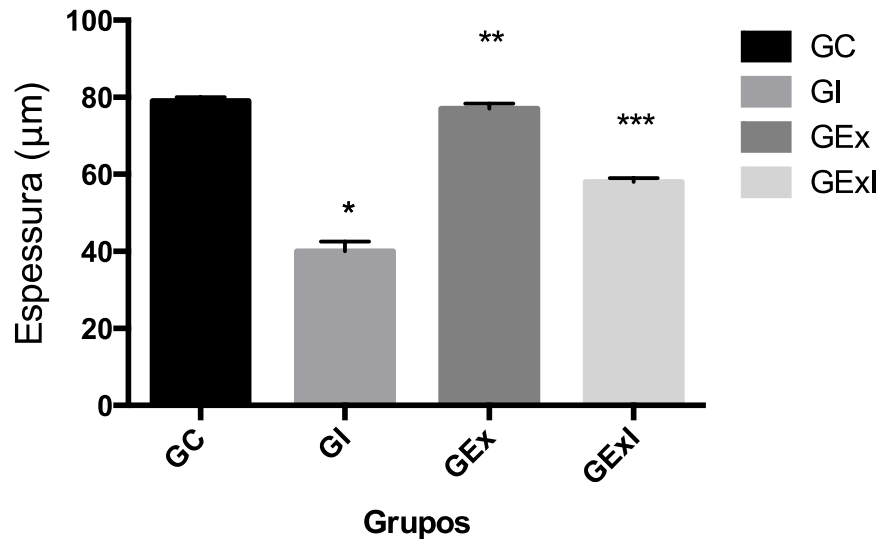


Figura 10 – A espessura total da cartilagem articular apresentou resultados estatisticamente significantes entre o GI * vs GC ($p < 0,0001$), GI * vs GEx ** ($p < 0,0001$), GI * vs GExI *** ($p < 0,0001$). Não houve diferença estatística entre os grupos GC vs GEx **.

As médias e desvios-padrão da espessura da camada superficial da região central da cartilagem articular do côndilo femoral medial nos quatro grupos estudados foram: GC ($21,20 \pm 0,7$), GI ($13,14 \pm 1,5$), GEx ($19,45 \pm 0,8$) e GExI ($17,38 \pm 0,8$).

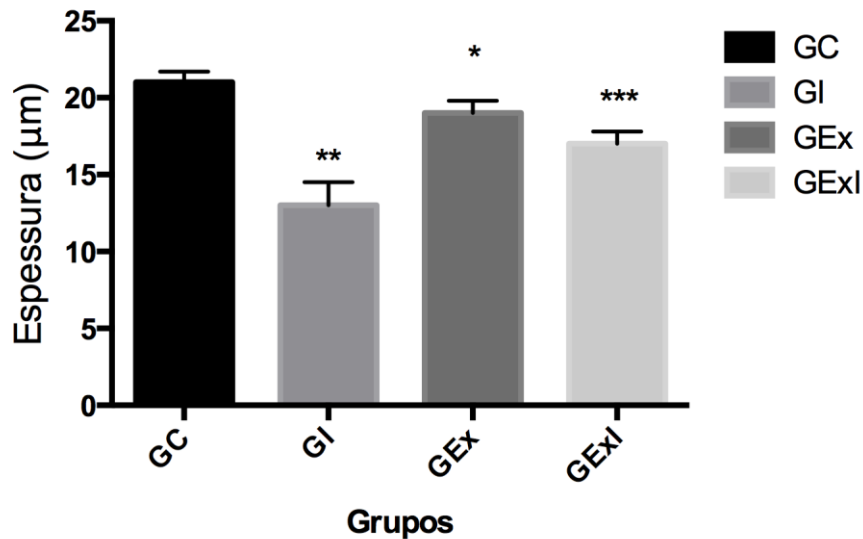


Figura 11 – Na camada superficial houve diferença estatisticamente significativa entre o GI ** vs GC ($p < 0,0001$), GI ** vs GEx * ($p < 0,0001$), GI ** vs GExI *** ($p < 0,0001$). Não houve diferença estatística entre os grupos GC vs GEx *.

As médias e desvios-padrão da espessura da camada média da região central da cartilagem articular do côndilo femoral medial nos quatro grupos estudados foram: GC ($28,20 \pm 0,9$), GI ($16,14 \pm 1,0$), GEx ($26,41 \pm 1,7$) e GExI ($19,38 \pm 0,8$).

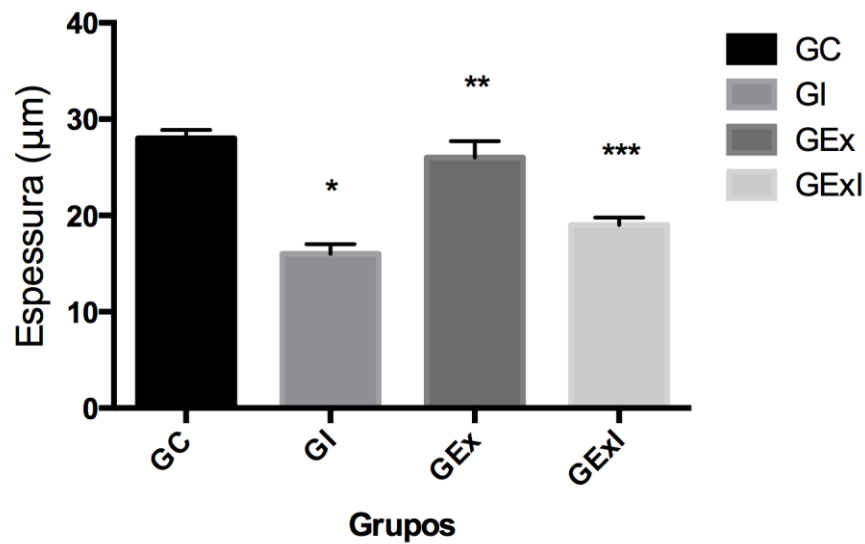


Figura 12 – Na camada média houve diferença estatisticamente significativa entre o GI * vs GC ($p < 0,0001$), GI * vs GEx ** ($p < 0,0001$), GI * vs GExI *** ($p < 0,0001$). Não houve diferença estatística entre os grupos GC vs GEx **.

As médias e desvios-padrão da espessura da camada profunda da região central da cartilagem articular do côndilo femoral medial nos quatro grupos estudados foram: GC ($30,20 \pm 0,5$), GI ($17,18 \pm 0,6$), GEx ($28,438 \pm 0,7$) e GExI ($24,32 \pm 0,4$).

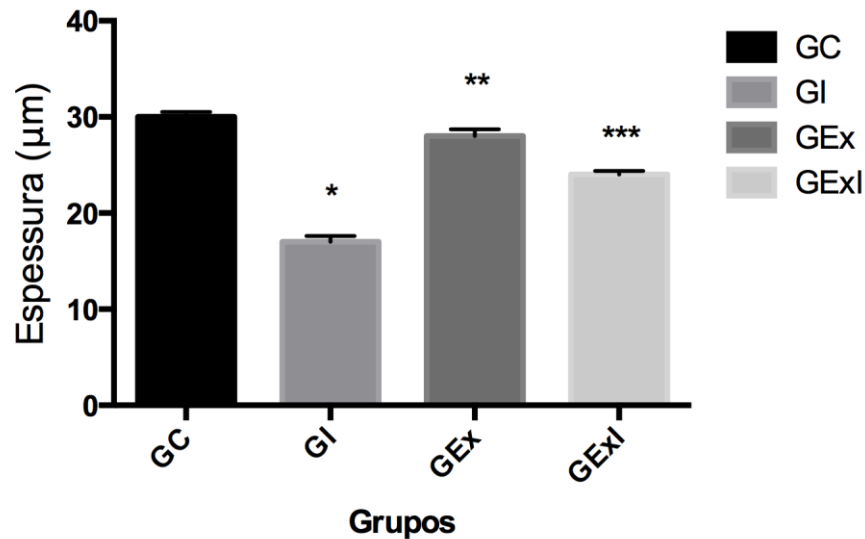


Figura 13 – Na camada profunda houve diferença estatisticamente significativa o GI * vs GC ($p < 0,0001$), GI * vs GEx ** ($p < 0,0001$), GI * vs GExI *** ($p < 0,0001$). Não houve diferença estatística entre os grupos GC vs GEx **.

As médias e desvios-padrão da densidade numérica (número por área) de condrócitos em todas as camadas da região central da cartilagem da cartilagem articular do côndilo femoral medial nos quatro grupos estudados foram: GC(80,00±0,5), GI(44,18±0,2), GEx(78,00±0,5) e GExI (70,00±0,6).

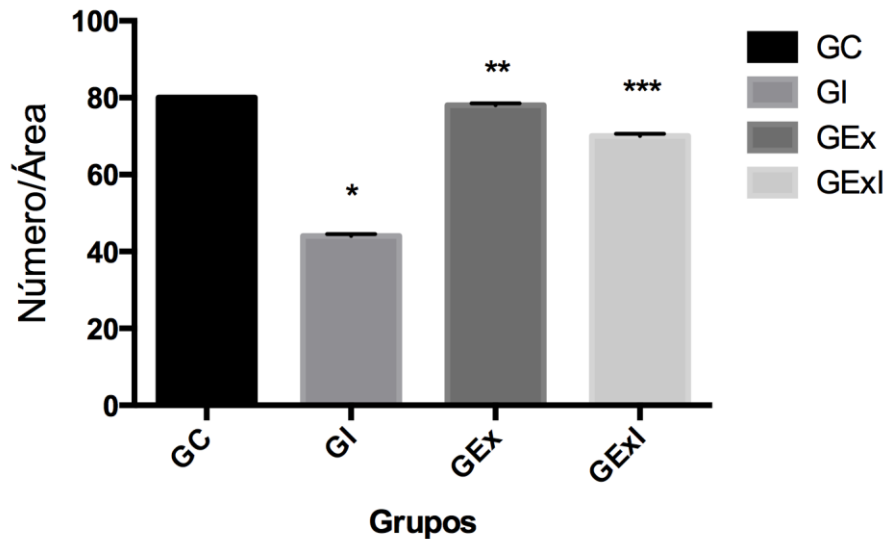


Figura 14 - A densidade numérica celular estimada para os quatro grupos estudados apresentou diferença estatísticas entre os grupos GI * vs GC ($p < 0,0001$), GI * vs GEx ** ($p < 0,0001$), GI * vs GExI *** ($p < 0,0001$). Não houve diferença estatística entre os grupos GC vs GEx **.

As médias e desvios-padrão da densidade numérica (número por área) de condrócitos localizados na camada superficial da região central da cartilagem articular do côndilo femoral medial nos quatro grupos estudados foram: GC(24,00±0,5), GI(16,00±0,2), GEx(23,00±0,7) e GExI (21,00±0,4).

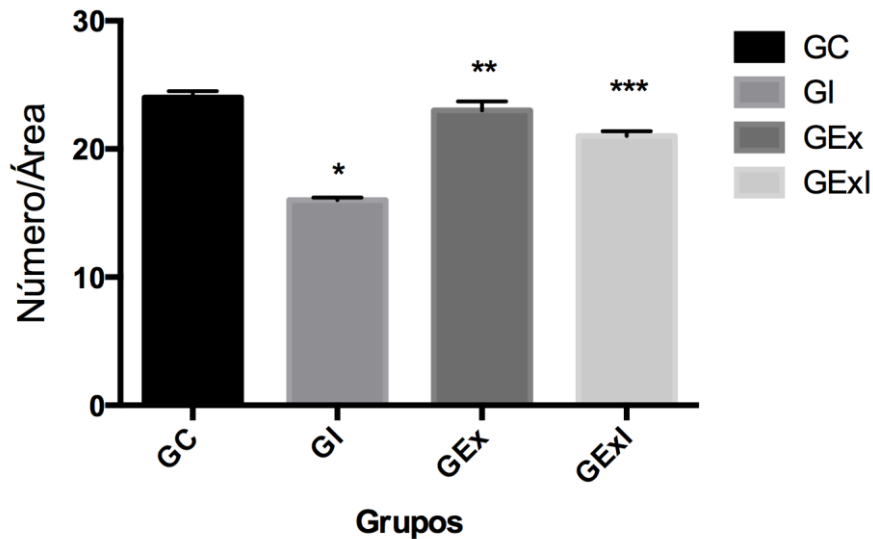


Figura 15 - Na camada superficial houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos estudados, ($p < 0,0001$).

As médias e desvios-padrão da densidade numérica (número por área) de condrócitos localizados na camada média da região central da cartilagem articular do côndilo femoral medial nos quatro grupos estudados foram: GC(29,00±0,3), GI(18,00±0,3), GEx(28,00±0,4) e GExI (26,00±0,2).

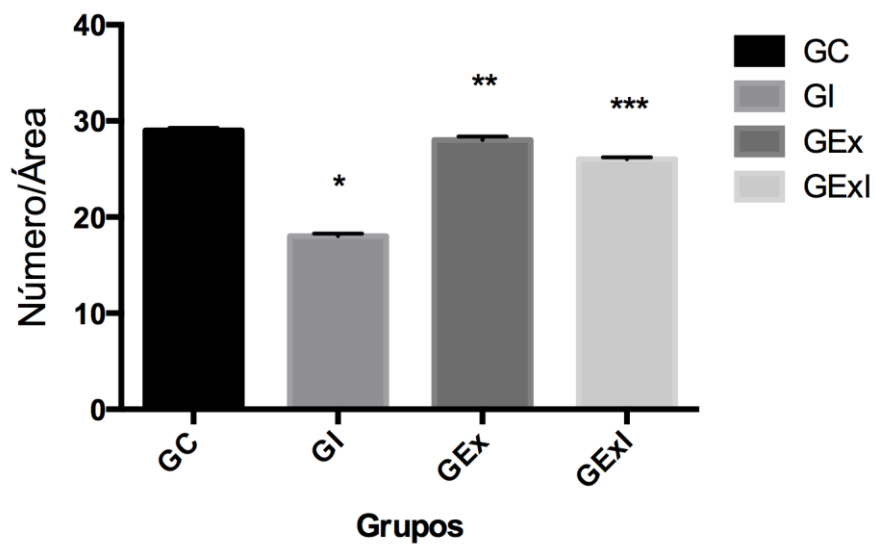


Figura 16 - Houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos estudados, ($p < 0,0001$).

As médias e desvios-padrão da densidade numérica (número por área) de condrócitos localizados na camada profunda da região central da cartilagem articular do côndilo femoral medial nos quatro grupos estudados. GC(26,32±1,2), GI(14,00±0,9), GEx(25,85±0,4) e GExI (22,35±0,9).

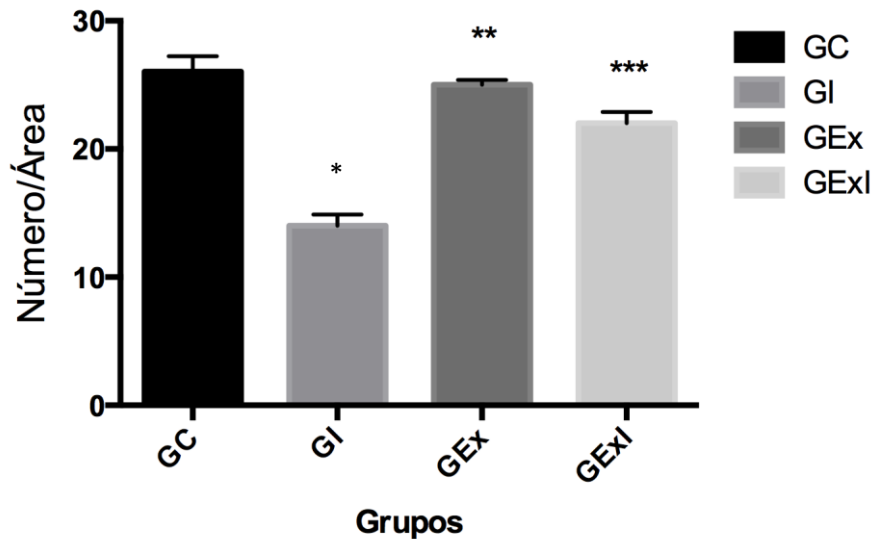


Figura 17 - Houve diferença estatisticamente significativa nos grupos GI * vs GC ($p < 0,0001$), GI vs GEx **($p < 0,0001$), GI vs GExI ***($p < 0,0001$). Não houve diferença estatística entre os grupos GC vs GEx.

As médias e desvios-padrão do volume nuclear médio dos condrócitos localizados na camada média da região central da cartilagem articular do côndilo femoral medial nos quatro grupos estudados foram: GC ($250,30 \pm 7,0$), GI ($190,21 \pm 10,23$), GEx ($340,34 \pm 13,45$) e GExI ($244 \pm 17,23$).

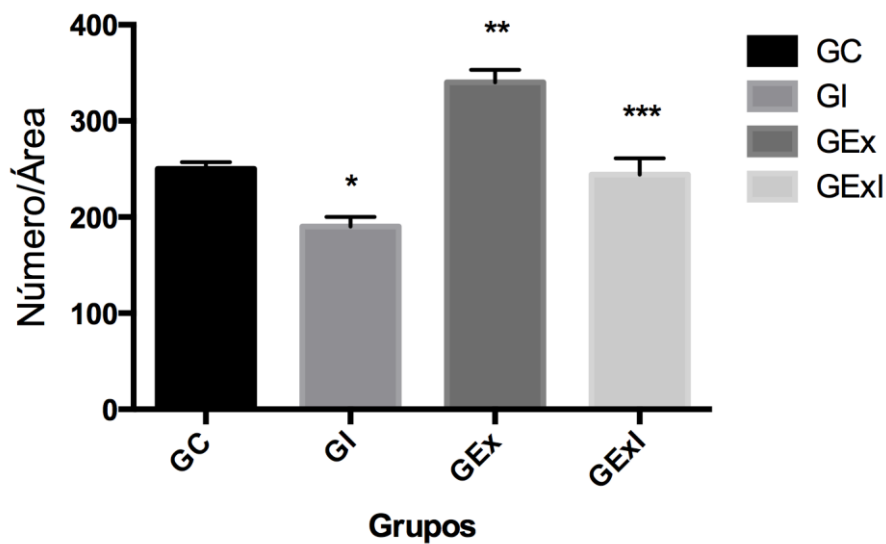


Figura 18 – O volume nuclear médio estimado nos quatro grupos estudados apresentou diferença estatística entre todos os grupos estudados, ($p < 0,0001$).

As médias e desvios-padrão das densidades de volume (porcentagens) de fibras colágenas localizadas na camada média da região central da cartilagem articular do côndilo femoral medial, nos quatro grupos estudados foram. GC (31,20±6,0), GI (26,16±0,4), GEx (37,24±4,3) e GExI (29±7,2).

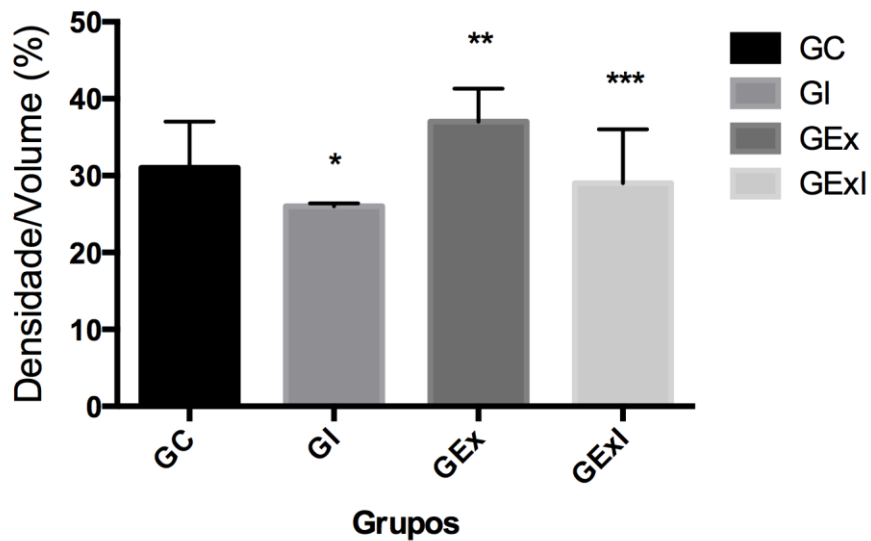


Figura 19 – A densidade de volume das fibras colágenas da camada média da cartilagem articular estimadas para os quatro grupos estudados apresentou diferença estatística, ($p < 0,0001$).

5. DISCUSSÃO

A prática de atividade física vem sendo cada vez mais valorizada para a manutenção da saúde. Os benefícios da realização de exercício físico são inúmeros e afetam todos os órgãos, mas principalmente os componentes do aparelho locomotor (FITZGERALD et al., 2002). Particularmente, em relação ao joelho, o exercício é recomendado inclusive como modalidade terapêutica para indivíduos com processos degenerativos, pois estudos demonstram que os exercícios ajudam a prevenir degenerações na cartilagem articular do joelho (LANGE et al., 2008).

Baseado nessas considerações, no presente estudo, utilizou-se um modelo de imobilização articular para explorar se as alterações que ocorrem na morfologia da cartilagem articular em animais sedentários que tiveram sua articulação imobilizada, descritas por autores como (BRANDT, 2003 e HAAPALA et al., 1999) diferem das observadas em animais previamente exercitados. Ou seja, nosso objetivo foi verificar, se o exercício pode proteger a cartilagem articular quando ela é submetida a um período de imobilização, como acontece por ocasião da ocorrência de fraturas por exemplo.

Duas conclusões principais emergiram deste estudo. Primeiro, a imobilização promoveu alterações morfológicas evidentes na espessura da cartilagem articular no grupo GI que não foram observadas no GExI, e nem no GEx, mostrando que o exercício protegeu a espessura da cartilagem contra os efeitos deletérios da imobilização. Em segundo lugar, o número de condrócitos, os tamanhos dos seus núcleos, e a densidade de volume de fibras colágenas após imobilização foram significativamente diminuídos (as) nos animais do GI, mas não nos do GExI ou do GEx. Estes resultados mostram que o exercício também atenuou os efeitos maléficos da imobilização nos condrócitos e no colágeno da cartilagem.

No presente trabalho, os animais imobilizados apresentaram uma diminuição significativa na espessura da cartilagem em comparação com os controles sedentários. Os resultados da literatura sobre o assunto são controversos. Alguns autores encontraram aumento da espessura da cartilagem (PALMOSKI et al., 1981), outros relataram uma diminuição da sua espessura (O'CONNOR et al., 1997; HINTERWIMMER et al., 2004; LIPHARDT et al., 2009) e outros relataram não ocorrer nenhuma mudança na espessura da cartilagem após imobilização

(KIVIRANTA et al., 1984; O'CONNOR et al., 1997; HAGIRAWA et al., 2009). Nossos resultados correspondem aos de O'CONNOR et al., (1997), HINTERWIMMER et al., (2004) e LIPHARDT et al., (2009), ou seja, a imobilização diminuiu a espessura da cartilagem. É possível que esta diferença de resultados seja devido a diferentes tempos de imobilização utilizados pelos autores ou diferentes métodos de imobilização utilizados. Os parágrafos seguintes ilustram esta afirmação.

Alguns autores estudaram a relação da permanência de tempo da articulação imobilizada com os efeitos sobre a cartilagem articular (LEROUX et al., 2001; BERTOLINI et al., 2009). LEROUX et al., (2001) e não encontraram diferença significativa nos efeitos da imobilização entre o membro imobilizado por 30 dias e o não imobilizado, contradizendo os achados de (BERTOLINI et al., 2009) que observaram redução na espessura da cartilagem nos grupos imobilizados por 7 dias e 14 dias.

De acordo com vários autores como (GYARMATI et al., 1987; HAAPALA et al., 1999) outros fatores podem contribuir para estes resultados contraditórios sobre os efeitos da imobilização na cartilagem articular: falta de um padrão em relação à área de medição da cartilagem, a idade dos animais, ou a utilização do joelho contralateral como controle. As diferenças entre os resultados podem também ser devidas ao valor do ângulo de imobilização utilizado no experimento, conduzindo a maior ou menor frouxidão articular e força de compressão diferente entre fêmur e tíbia (CARVALHO et al., 1977).

A diminuição da espessura da cartilagem articular e de suas camadas em ratos imobilizados parece ser consequência do declínio da atividade sintética dos condrócitos durante a imobilização (PALMOSKI et al., 1981; ANDO et al., 2008). Este declínio influencia na estrutura da MEC, o que conduz a diminuição gradual na espessura da cartilagem (PALMOSKI et al., 1981; O'CONNOR et al., 1997). As variações na síntese da MEC da cartilagem pelos condrócitos são comuns e benéficas ao longo da vida, sendo que sua finalidade é a de adaptar a cartilagem articular às necessidades mecânicas e químicas dos indivíduos a partir do período fetal até longevidade (KARNOVEN et al., 1994). É também possível que a redução na espessura da cartilagem com a imobilização aconteça através da diminuição da produção de líquido sinovial e do fornecimento de nutrientes para a cartilagem, determinada pela falta de movimento e de carga, o que produz um déficit na difusão de líquidos e no bombeamento dos elementos nutritivos para a cartilagem

(O'CONNOR et al., 1997; HAGIRAWA et al., 2009).

O presente estudo demonstrou uma diminuição significativa no número de condrócitos da cartilagem nos animais do GI. Este resultado é consistente com os resultados de trabalhos anteriores (HULDEIMAER et al., 2001; ANDO et al., 2008; MORIYAMA et al., 2008; HAGIRAWA et al., 2009). Segundo (TRUDEL et al., 2005) essa redução ocorre devido ao mecanismo de apoptose dos condrócitos.

A diminuição do número de condrócitos apontada no presente estudo e nos trabalhos dos autores citados acima difere dos resultados apontados por TOMITA et al., 2002 e de BERTOLINI et al., (2009) que verificaram que após a imobilização da articulação por cinco dias houve aumento do número de condrócitos, principalmente na superfície articular. Esse aumento também é apontado por Del Carlo et al., (2007), que realizou imobilização por 45 dias em seus trabalhos. Esta diferença de resultados talvez seja devida a metodologia utilizada por estes autores para quantificação dos condrócitos.

Aceitando a hipótese de que os condrócitos diminuem em número com a imobilização, como essas células regulam o metabolismo da matriz extracelular e mantém a estrutura da cartilagem, a diminuição do número de condrócitos poderia explicar a diminuição na densidade de volume de fibras colágenas e a diminuição da espessura da cartilagem durante a imobilização. Além disso, com a imobilização, provavelmente há uma diminuição da atividade celular em todas as camadas da cartilagem articular, que pode estar associada a uma redução da quantidade do fator de crescimento presente na cartilagem (KARNOVEN, 1994; ROUGHLEY, 2001), o que levaria a diminuição na densidade do colágeno e outros componentes da MEC (MORIYAMA et al., 2008). Entretanto, estes resultados diferem dos de Akeson et al., (1987) quando afirmam que a imobilização articular não causa diminuição das fibras colágenas na cartilagem.

O presente estudo demonstrou que os efeitos da imobilização sobre a cartilagem articular foram menos evidentes nos animais exercitados em relação aos não exercitados. Este resultado confirma indiretamente os resultados de estudos que demonstram que o movimento articular e a descarga de peso asseguram a funcionalidade da cartilagem e mantém as suas propriedades celulares e comportamento mecânico (GYARMATI et al., 1987; O'CONNOR, 1997). Vários outros trabalhos têm mostrado que a aplicação de carga de compressão constante é capaz de manter a estrutura normal da cartilagem articular (KARVONEN et al., 1994;

HULDEIMAIER et al., 2001; ROUGHLEY, 2001), porque a intensidade de estímulos mecânicos modula as respostas funcionais dos condrócitos (LOESER, 2000; BEAUPRÉ et al., 2000; TRUDEL, 2005). Corroboram com esta teoria, estudos de GALOIS et al., (2004) em que foi demonstrado que o exercício aeróbio diminuiu a apoptose dos condrócitos em animais com osteoartrite, tendo sido descrito também por CIFUENTES et al., (2010) aumento dos níveis de enzimas que atuam na defesa contra a ocorrência de estresse oxidativo e preservação do conteúdo de PGs em cartilagens articulares.

A razão pela qual os animais exercitados tiveram os efeitos deletérios reduzidos pela imobilização permanece por esclarecer. Sabe-se que a atividade física moderada constante aumenta a síntese e concentração das PGs e GAGs (KIVIRANTA, 1988; KIM, SAH, 1994; BUCKWALTER, 1995; JULKUNEN et al., 2010) e outros componentes da MEC (TRATTNIG, 1997; MATYAS et al., de 2002), e preserva a espessura da cartilagem (ESPANHA et al., 2001), atuando como efeito condroprotetor, levando a melhorias nas propriedades biológicas e biomecânicas da cartilagem articular (OTTERNESS et al., 1998; POOLE et al., 2001). Como consequência, reduzindo o estímulo mecânico, como ocorreu na imobilização articular, haveria um efeito menos prejudicial em uma cartilagem mais preparada, ou seja, com maior resistência, promovida pelo exercício. A maior intensidade e frequência de estímulos de compressão, decorrentes do exercício possivelmente induzem a uma atividade aumentada dos condrócitos, que é identificada pelo aumento de seu volume nuclear e da espessura da cartilagem, o que conduz a uma maior resistência à compressão. É possível ainda outra explicação. A consequência do exercício pode ser o aumento da hidratação da MEC resultando em maior resistência mecânica e elasticidade e um consequente aumento do número de fibras colágenas, que geram uma maior resistência à deformação e implicam menor rigidez, deixando a cartilagem mais elástica e assim mais resistente. Estes fatos poderiam reduzir o risco de degradação da cartilagem, quando ela fosse submetida à menor de sobrecarga mecânica, gerada pela imobilização articular.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados nesse trabalho, podemos concluir que após o processo de imobilização da articulação do joelho em ratos Wistar não exercitados houve:

- 1.** Diminuição da espessura de todas as camadas articulares da cartilagem articular do fêmur, levando a diminuição da espessura da cartilagem. A camada que sofreu maior diminuição foi a superficial, seguida pelas camadas média e profunda.
- 2.** Diminuição do número dos condrócitos em todas as camadas da cartilagem articular, com maior interferência na camada superficial.
- 3.** Diminuição do volume nuclear dos condrócitos na camada média.
- 4.** Diminuição da densidade de volume das fibras colágenas na camada média.

Nos animais exercitados previamente, a imobilização promoveu efeitos deletérios minimizados nas seguintes estruturas:

- 5.** Espessura das camadas articulares, não havendo maior interferência em alguma camada específica.
- 6.** Número de condrócitos: o exercício evitou uma diminuição exacerbada na densidade numérica de condrócitos após o processo de imobilização.
- 7.** Volume nuclear dos condrócitos da camada média: o exercício evitou diminuição exagerada no volume nuclear.
- 8.** Densidade de volume de fibras colágenas da camada média: o exercício evitou uma diminuição exacerbada da densidade de volume das fibras colágenas da matriz da cartilagem.

Análise Estatística

Parameter "Espessura - camada superficial"

"Table Analyzed" "Data 1"

"One-way analysis of variance"

" P value" "< 0.0001"

" P value summary"***

" Are means signif. different? (P < 0.05)" Yes

" Number of groups" 4

" F" 76,82

" R squared" 0,7520

"Bartlett's test for equal variances"

" Bartlett's statistic (corrected)" 21,79

" P value" "< 0.0001"

" P value summary"***

" Do the variances differ signif. (P < 0.05)" Yes

"ANOVA Table" SS df MS

" Treatment (between columns)" 559,3 3 186,4

" Residual (within columns)" 184,4 76 2,427

" Total" 743,7 79

"Tukey's Multiple Comparison Test" "Mean Diff."

q "Significant? P < 0.05?" Summary "95% CI of diff"

" GC vs GI" 6,502 18,66 Yes *** "5.205 to 7.798"

" GC vsGEx" 0,6740 1,935 No ns "-0.6229 to 1.971"

" GC vsGExI" 4,181 12,00 Yes *** "2.885 to 5.478"

" GI vsGEx" -5,828 16,73 Yes *** "-7.124 to -4.531"

" GI vsGExI" -2,320 6,660 Yes *** "-3.617 to -1.023"

" GExvsGExI" 3,508 10,07 Yes *** "2.211 to 4.804"

Parameter "Espessura - camada média"

"TableAnalyzed" "Data 1"

"One-way analysis of variance"

" P value" "< 0.0001"

" P value summary"***

" Are means signif. different? (P < 0.05)" Yes

" Number of groups" 4

" F" 83,36

" R squared"0,7669

"Bartlett's test for equal variances"

" Bartlett's statistic (corrected)" 31,53

" P value" "< 0.0001"

" P value summary"***

" Do the variances differ signif. (P < 0.05)" Yes

"ANOVA Table" SS df MS

" Treatment (between columns)" 1080 3 360,0

" Residual (within columns)" 328,2 76 4,318

" Total" 1408 79

"Tukey's Multiple Comparison Test" "Mean Diff."

q "Significant? P < 0.05?" Summary "95% CI of diff"

" GC vs GI" 8,923 19,20 Yes *** "7.193 to 10.65"

" GC vsGEx" 1,296 2,788 No ns "-0.4345 to 3.026"

" GC vsGExI" 6,569 14,14 Yes *** "4.839 to 8.299"

" GI vsGEx" -7,628 16,42 Yes *** "-9.358 to -5.897"

" GI vsGExI" -2,3545,066 Yes ** "-4.084 to -0.6240"

" GExvsGExI" 5,274 11,35 Yes *** "3.543 to 7.004"

Parameter "Espessura - camada profunda"

"TableAnalyzed" "Data 1"

"One-way analysis of variance"

" P value" "< 0.0001"

" P value summary"***

" Are means signif. different? (P < 0.05)" Yes

" Number of groups" 4

" F" 284,1

" R squared"0,9181

"Bartlett's test for equal variances"

" Bartlett's statistic (corrected)" 12,79

" P value" 0,0051

" P value summary"**

" Do the variances differ signif. (P < 0.05)" Yes

"ANOVA Table" SS df MS

" Treatment (between columns)" 1934 3 644,6

" Residual (within columns)" 172,5 76 2,269

" Total" 2106 79

"Tukey's Multiple Comparison Test" "Mean Diff."

q "Significant? P < 0.05?" Summary "95% CI of diff"

" GC vs GI" 11,86 35,20 Yes *** "10.60 to 13.11"

" GC vsGEx" 0,9525 2,828 No ns "-0.3016 to 2.207"

" GC vsGExI" 7,899 23,45 Yes *** "6.644 to 9.153"

" GI vsGEx" -10,91 32,37 Yes *** "-12.16 to -9.651"

" GI vsGExI" -3,959 11,75 Yes *** "-5.213 to -2.705"

" GExvsGExI" 6,946 20,62 Yes *** "5.692 to 8.200"

Parameter "Espessura – total"

"Table Analyzed" "Data 1"

"One-way analysis of variance"

" P value" "< 0.0001"

" P value summary"***

" Are means signif. different? (P < 0.05)" Yes

" Number of groups" 4

" F" 55,58

" R squared"0,9124

"Bartlett's test for equal variances"

" Bartlett's statistic (corrected)" 34,26

" P value" "< 0.0001"

" P value summary"***

" Do the variances differ signif. (P < 0.05)" Yes

"ANOVA Table"	SS	df	MS
" Treatment (between columns)"	4183	3	1394
" Residual (within columns)"	401,4	16	25,09
" Total"	4584	19	

"Tukey's Multiple Comparison Test"				"Mean Diff."	
q	"Significant? P < 0.05?"	Summary	"95% CI of diff"		
" GC vs GI"	35,27 15,75 Yes	***	"26.21 to 44.34"		
" GC vsGEx"	1,320 0,5893	No	ns	"-7.743 to 10.38"	
" GC vsGExI"	19,22 8,579 Yes	***	"10.15 to 28.28"		
" GI vsGEx"	-33,95 15,16	Yes	***	"-43.02 to -24.89"	
" GI vsGExI"	-16,06 7,169 Yes	***	"-25.12 to -6.995"		
" GExvsGExI"	17,90 7,989 Yes	***	"8.833 to 26.96"		

Parameter "Número total - Condrócitos"

"TableAnalyzed" "Data 1"

"One-way analysis of variance"

" P value" "< 0.0001"

" P value summary"***

" Are means signif. different? (P < 0.05)" Yes

" Number of groups" 4

" F" 318,2

" R squared"0,9835

"Bartlett's test for equal variances"

" Bartlett's statistic (corrected)" 2,098

" P value" 0,5523

" P value summary"ns

" Do the variances differ signif. (P < 0.05)" No

"ANOVA Table" SS df MS

" Treatment (between columns)" 3437 3 1146

" Residual (within columns)" 57,60 16 3,600

" Total" 3495 19

"Tukey's Multiple Comparison Test" "Mean Diff."

q "Significant? P < 0.05?" Summary "95% CI of diff"

" GC vs GI" 32,40 38,18 Yes *** "28.97 to 35.83"

" GC vsGEx" 0,6000 0,7071 No ns "-2.833 to 4.033"

" GC vsGExI" 10,40 12,26 Yes *** "6.967 to 13.83"

" GI vsGEx" -31,80 37,48 Yes *** "-35.23 to -28.37"

" GI vsGExI" -22,00 25,93 Yes *** "-25.43 to -18.57"

" GExvsGExI" 9,800 11,55Yes *** "6.367 to 13.23"

Parameter

"TableAnalyzed" "Número de condrocitos - camada superficial"

"One-way analysis of variance"

" P value" "< 0.0001"

" P value summary"***

" Are means signif. different? (P < 0.05)" Yes

" Number of groups" 4

" F" 263,9

" R squared"0,9124

"Bartlett's test for equal variances"

" Bartlett's statistic (corrected)" 9,013

" P value" 0,0291

" P value summary"*

" Do the variances differ signif. (P < 0.05)" Yes

"ANOVA Table" SS df MS

" Treatment (between columns)" 830,3 3 276,8

" Residual (within columns)" 79,70 76 1,049

" Total" 910,0 79

"Tukey's Multiple Comparison Test" "Mean Diff."

q "Significant? P < 0.05?" Summary "95% CI of diff"

" GC vs GI" 8,550 37,34 Yes *** "7.697 to 9.403"

" GC vsGEx" 1,650 7,206 Yes *** "0.7975 to 2.503"

" GC vsGExI" 2,700 11,79 Yes *** "1.847 to 3.553"

" GI vsGEx" -6,900 30,13 Yes *** "-7.753 to -6.047"

" GI vsGExI" -5,850 25,55 Yes *** "-6.703 to -4.997"

" GExvsGExI" 1,050 4,585 Yes ** "0.1975 to 1.903"

Parameter

"TableAnalyzed" "Número de condrócitos - camada média"

"One-way analysis of variance"

" P value" "< 0.0001"

" P value summary"***

" Are means signif. different? (P < 0.05)" Yes

" Number of groups" 4

" F" 214,1

" R squared"0,8942

"Bartlett's test for equal variances"

" Bartlett's statistic (corrected)" 1,463

" P value" 0,6909

" P value summary"ns

" Do the variances differ signif. (P < 0.05)" No

"ANOVA Table" SS df MS

" Treatment (between columns)" 1591 3 530,4

" Residual (within columns)" 188,3 76 2,478

" Total" 1780 79

"Tukey's Multiple Comparison Test" "Mean Diff."

q "Significant? P < 0.05?" Summary "95% CI of diff"

" GC vs GI" 11,45 32,53 Yes *** "10.14 to 12.76"

" GC vsGEx" 1,400 3,978 Yes * "0.08958 to 2.710"

" GC vsGExI" 2,850 8,097 Yes *** "1.540 to 4.160"

" GI vsGEx" -10,05 28,55 Yes *** "-11.36 to -8.740"

" GI vsGExI" -8,600 24,43 Yes *** "-9.910 to -7.290"

" GExvsGExI" 1,450 4,120 Yes * "0.1396 to 2.760"

Parameter

"TableAnalyzed" "Número de condrocitos - camada profunda"

"One-way analysis of variance"

" P value" "< 0.0001"

" P value summary"***

" Are means signif. different? (P < 0.05)" Yes

" Number of groups" 4

" F" 51,06

" R squared"0,6684

"Bartlett's test for equal variances"

" Bartlett's statistic (corrected)" 7,194

" P value" 0,0660

" P value summary"ns

" Do the variances differ signif. (P < 0.05)" No

"ANOVA Table" SS df MS

" Treatment (between columns)" 1783 3 594,3

" Residual (within columns)" 884,6 76 11,64

" Total" 2668 79

"Tukey's Multiple Comparison Test" "Mean Diff."

q "Significant? P < 0.05?" Summary "95% CI of diff"

" GC vs GI" 12,20 15,99 Yes *** "9.360 to 15.04"

" GC vsGEx" 1,400 1,835 No ns "-1.440 to 4.240"

" GC vsGExI" 4,500 5,899 Yes *** "1.660 to 7.340"

" GI vsGEx" -10,80 14,16 Yes *** "-13.64 to -7.960"

" GI vsGExI" -7,700 10,09 Yes *** "-10.54 to -4.860"

" GExvsGExI" 3,100 4,064 Yes * "0.2597 to 5.940"

Parameter "Volume nuclear - Condrócitos"

"Table Analyzed" "Data 1"

"One-way analysis of variance"

" P value" "< 0.0001"

" P value summary"***

" Are means signif. different? (P < 0.05)" Yes

" Number of groups" 4

" F" 90790

" R squared"0,9999

"Bartlett's test for equal variances"

" Bartlett's statistic (corrected)" 1,297

" P value" 0,7297

" P value summary"ns

" Do the variances differ signif. (P < 0.05)" No

"ANOVA Table" SS df MS

" Treatment (between columns)" 87770 3 29260

" Residual (within columns)" 11,60 36 0,3222

" Total" 87780 39

"Tukey's Multiple Comparison Test" "Mean Diff."

q "Significant? P < 0.05?" Summary "95% CI of diff"

" GC vs GI" 37,80 210,6 Yes *** "37.12 to 38.48"

" GC vsGEx" -87,20 485,8 Yes *** "-87.88 to -86.52"

" GC vsGExI" 10,80 60,17 Yes *** "10.12 to 11.48"

" GI vsGEx" -125,0696,4 Yes *** "-125.7 to -124.3"

" GI vsGExI" -27,00 150,4 Yes *** "-27.68 to -26.32"

" GExvsGExI" 98,00 545,9 Yes *** "97.32 to 98.68"

Parameter "Densidade - fibras colágenas"

"TableAnalyzed" "Data 1"

"One-way analysis of variance"

" P value" "< 0.0001"

" P value summary"***

" Are means signif. different? (P < 0.05)" Yes

" Number of groups" 4

" F" 429,6

" R squared" 0,9443

"Bartlett's test for equal variances"

" Bartlett's statistic (corrected)" 1,544

" P value" 0,6721

" P value summary"ns

" Do the variances differ signif. (P < 0.05)" No

"ANOVA Table" SS df MS

" Treatment (between columns)" 861,4 3 287,1

" Residual (within columns)" 50,80 76 0,6684

" Total" 912,2 79

"Tukey's Multiple Comparison Test" "Mean Diff."

q "Significant? P < 0.05?" Summary "95% CI of diff"

" GC vs GI" 3,400 18,60 Yes *** "2.719 to 4.081"

" GC vsGEx" -5,000 27,35 Yes *** "-5.681 to -4.319"

" GC vsGExI" 2,600 14,22 Yes *** "1.919 to 3.281"

" GI vsGEx" -8,400 45,95 Yes *** "-9.081 to -7.719"

" GI vsGExI" -0,8000 4,376 Yes * "-1.481 to -0.1194"

" GExvsGExI" 7,600 41,57 Yes *** "6.919 to 8.281"

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams ME. Cartilage hypertrophy following canine anterior cruciate ligament transection differs among different areas of the joint. *Journal Rheumatol.* 1989;16: 818-24.
- Aigner T; Soeder S; Haag J. IL-1beta and BMPs--interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration. *Eur Cell Mater.* 2006;12:49-56.
- Akeson WH; Amiel D; Abel MF. Effects of immobilization on joints. *Clin Orthop Relat Res.* 1987;219:28-37.
- Alford JW, Cole BJ. Cartilage Restoration, Part 1. *American Journal of Sports Medicine.* 2005;33.
- Anderson CE. The structure and function of cartilage. *Journal of Bone and joint Surgery.* 1962;44:777-786.
- Ando A; Hagiwara Y; Chimoto E; Hatori K; Onoda Y; Itoi E. Intra-articular injection of hyaluronan diminishes loss of chondrocytes in a rat immobilized-knee model. *Tohoku J Exp Med.* 2008;215:4:321-331.
- Angel J; Razzano p; Grande D. Defining the challenge: The basic science of articular cartilage repairs and response to injury. *Sports Med Arthrosc Rev.* 2003;1:168-181.
- Appleton CTG; McErlain DD; Pitelka V; Schwartz N, Bernier SM, Henry J. Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2007;9:3-15.
- Beaupré GCF; Stevens SS; Carter DR. Mechanobiology in the development, maintenance and degeneration of articular cartilage. *J Rehab Res and Devel* 2000;37:2:145-151.
- Behrens F, Kraft EL, Oegema, TR. Biomechanical changes in articular cartilage after joint immobilization by casting or external fixation. *Journal orthop.* 1989;7:335-343.
- Bertolini SMMG; Oliveira PD; Cararo DC; Tamyozo MF. Response of the knee's joint structures in rats after immobilization. *Revista Ciência e Saúde.* 2009;2:1:8-15.
- Bihari-Varga M, Frakas T, Biró T. Changes in the cartilage proteoglycans in relation to age and osteoarthrosis. *Acta Biol Hung.* 1984;35:325-31.

Bonassar LJ; Frank EH; Murray JC; Paguio CG; Moore V; Lark MW; Sandy JD; Wu JJ; Eyre DR; Grodzinsky AJ. Change in cartilage composition and physical properties due to stromelysin degradation. *Arthritis Rheum.* 1995;38:32:173-83.

Brandt KD. Response of joint structures to inactivity and to reloading after immobilization. *Arth. e Rheum.* 2003;49:267-271.

Bruel A,Oxlund H,Nyengard JR. Growth hormone increases the number of myocyte nuclei in the rat left ventricle of adults rats. *Growth Hormone & IGF Research.* 2002;12:16-115.

Bruel A,Oxlund H,Nyengard JR. The total length of myocytes and capillaries, and total number of myocyte nuclei in the rat heart are time-dependently increased by growth hormone. *Growth Hormone & IGF Research.* 2005;15:256–264.

Buckwalter JA. Osteoarthritis and articular cartilage use, disuse, and abuse: experimental studies. *Journal Rheum.*1995;22:13-15.

Buckwalter JA, Woo SL, Goldberg VM. Soft tissue aging and musculoskeletal function. *J Bone Joint Surg Am.* 1993;75:1533-1548.

Camanho GL. Tratamento Da Osteoartrose Do Joelho. *Revista Brasileira De Ortopedia.* 2001;36:5.

Carvalho A, Langfeldt B (1977). Running practice and arthrosis deformans. A radiological assessment. *Ugeskr. Laeger.* **139**, 2621-2622.

Cifuentes DJ; Rocha LG; Silva LA; Brito AC; Rueff-Barroso CR; Porto LC. Decrease in oxidative stress and histological changes induced by physical exercise calibrated in rats with osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2010;18:1088-1095.

Currier PD; Nelson MR. Dynamics of human biologic tissues. F. A Davis, 1992.

Del Carlo RJ, Galvão MR, Vilorio MIV, Natali AJ, Barbosa ALT, Monteiro BS, Pinheiro LC. Imobilização prolongada e remobilização da articulação fêmoro-tíbio-patelar de ratos: estudo clínico e microscópico. *Arquivo Brasileiro de medicina veterinária e zootecnia.* 2007;59:363-370.

Dishman RK, Armstrong RB, Delp MD, Graham RE, Dunn AL. Open-field behavior is not

related to treadmill performance in exercising rats. *Physiological Behavior*. 1988;43:541-546.

Dunham J; Shackleton DR; Billingham ME; Bitensky L; Chayen J; Muir H. A reappraisal of structure of normal canine articular cartilage. *J anat*. 1988;157:88-99.

Eyre D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res*. 2002;4:30-35.

Espanha MM; Lammi PE; Hyttinen MM; Lammi MJ; Helminen HJ. Extracellular matrix composition of full-thickness defect repair tissue is little influenced by exercise in rat articular cartilage. *Conn Tis Res*. 2001;42:2:97-109.

Felice JC, Costa LFC, Duarte DG, Chahade. Elementos básicos de diagnóstico da osteoartrose. *Temas de Reumatologia Clínica*. 2002;11:68-81.

Fitzgerald GK; Childs JD; Ridge TM; Irrgang JJ. Agility and perturbation training for a physically active individual with knee osteoarthritis. *Phys Ther*. 2002;82:4:372-382.

Frateschi MEBJM. Efeitos da imobilização e remobilização em algumas propriedades mecânicas do osso (Dissertação de Mestrado em Bioengenharia). Instituto de Química de São Carlos: Universidade de São Paulo, 2002.

Fu N, Maffulli KMH. Articular Cartilage Lesions of the Knee Following Immobilization or Destabilization for 6 or 12 Weeks in Rabbits. *Clinical Rheumatology*. 1998;17:227-233.

Galois L; Etienne S; Grossin L; Watrin-pinzano A; Cournil-Henrionnet C; Loeuille P; Netter D. Dose-response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: a pilot study. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2004;12:779-786

Gault SJ; Spyker JM. Beneficial effect of immobilization of joint in rheumatoid and related arthritis: a splint study using sequential analysis. *Arthritis Rheumatology*. 1969;12:34-44.

Gyarmati J; Foldes I; Kern M. Morphological studies on the articular cartilage of old rats. *Acta Morphol Hung*. 1987;35:111-124.

Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 2000;43:16-26.

Gomes L. Proteoglicanos. In: Carvalho HF, Recco-Pimentel SM. *A célula*. São Paulo. Manole ed; 2001; p. 221-7.

Haapala J; Arokoski JPA; Hyttinen MK; Lammi M; Tammi M; Kovanen V; Helminen HJ; Kiviranta I. Remobilization does not fully restore immobilization induced articular cartilage atrophy. *Clinical OrthopRel Res*. 1999;362:218-229.

Haapala J; Aroski JPA; Ronkko S; Agren U; Kosma VM; Lohmander LS; Tammi M; Helminen HJ; Kiviranta I. Decline after immobilization and recovery after remobilization of synovial fluid IL1, TIMP and chondroitin sulphate levels in young beagle dogs. *Ann Rheum Dis*. 2001;60:55-60.

Hagiwara Y; Ando A; Chimoto E; Saijo Y; Ohmori-Matsuda K; Ohmori-Matsuda; Itoi E. Changes of articular cartilage after immobilization in a rat knee contracture model. *Journal Orthopedic Res*. 2009;27:2:236-242.

Hall AC; Urban JPG; Gehl KA. Effects of compression on the loss of newly synthesized proteoglycans and proteins from cartilage explants. *Arch Biochem Biophys*. 1991;286:20-29.

Hardingham TE; Fosang AJ; Dudhia J. Agrecan, the Chondroitin Sulfate/Keratan Sulfate Proteoglycan from Cartilage. *Osteoarthritis*. 1992;2:5-7.

Hinterwimmer S; Krammer M; Krotz M. Cartilage atrophy in the knees of patients after seven weeks of partial load bearing. *Arthritis Rheum*. 2004;50:2516-2520.

Huber M; Trattnig S; Lintner F. Anatomy, biochemistry and physiology of articular cartilage. *Invest Radiol*. 2000;35:10:573-580.

Hulthelmaier M; Glaser C; Englmeier KH; Reiser M; Putz R; Eckstein F. Age-related changes in the morphology and deformational behavior of knee joint cartilage. *Arthritis Rheum*. 2001;44:11:2556-2561.

Hurley DJ; Eckstein F. Exercise and osteoarthritis. *J. Anat*. 2009;214:197-207.

Hurley MV; Scott DL. Improvements in quadriceps sensorimotor function and disability of patients with knee osteoarthritis following a clinically practicable exercise regime. *Br J Rheumatol*. 1998;37:1181-1187.

Hyttinen MM, Arokoski JPA, Parkkinen JJ, et al. Age matters: collagen birefringence of superficial articular cartilage is increased in young guinea-pigs but decreased in older animals after identical physiological type of joint loading. *Osteoarth Cart*. 2001;9:694–701.

Iliyydro MM; Cmynuha TA; Epodpeeb CA. Experimental study of the articular. *Morfologiya*. 2005;128:5:67-71.

Ishiguro N; Kojima T; Poole R. Mechanism of cartilage destruction in osteoarthritis. *J Med Sci*, v. 65, p. 73-84, 2002.

Jones O; Glisson M; Hynes K; Cicuttini F. Sex and site differences in cartilage development – a possible explanation for variations in knee osteoarthritis in later life. *Arthritis Rheum*. 2000;43:11:2543-2549.

Jortikka M; Inkinen R; Tammi M. Immobilization causes long lasting matrix changes both in the immobilized and contralateral jointcartilage. *Ann Rheum Dis.* 1997;56:255-261.

Julkunen P; Halmesmaki PE; Livarinen J, Rieppo L, Närhi T, Marjanen J, Rieppo J, Arokoski J, Brama A. P, Jurvelin S J, Helminen J H. Effects of growth and exercise on composition, structural maturation and appearance of osteoarthritis in articular cartilage of hamsters. *Journal of Anatomy.* 2010;217:262-274.

Junqueira LC; Bognoles G; Bretani RR. Picrossirius staining tissue sections. *Histochem J.* 1979;447-55.

Jurvelin J; Kiviranta I; Tammi M. Softening of canine articular cartilage after immobilization of the knee joint. *ClinOrthopRelat.* 1986;207:246–252.

Józsa L; Sarvinen M; Kannus S; Réffly A. Fine structural changes in the articular cartilage of the rat's knee following short-term immobilization in various position: A scanning electron microscopical study. *International Orthopaedics (sicot)* 1987;11:129-133.

Kaab MJ; Gwyn IA; Notzli HP. Collagen fibre arrangement in the tibial plateau articular cartilage of man and other mammalian species. *J Anat.* 1998;193:23-34.

Karvonen RL, Negendank WG, Teitge RA, Reed AH, Miller PR, Fernandez-Madrid F. Factors affecting articular cartilage thickness in osteoarthritis and aging. *J Rheumatol.* 1994;21:1310–1318.

Kim YJ; Sah RL; Grodzinsky AJ; Plass AHK; Sandy JD. Mechanical regulation of cartilage biosynthetic behavior: Physical stimuli. *Arch Biochem Biophys.* 1994;311:1:1-12.

Kiviranta I; Jurvelin J; Tammi M; Saamanen AM; Helminen JH. Weight bearing controls glycosaminoglycan concentration and articular cartilage thickness in the knee joints of young beagle dogs. *Arthritis Rheum.* 1987;7:30:801-809.

Kiviranta I; Tammi M; Jurvelin J. Fixation, descalcification and tissue processing effects on articular cartilage proteoglycans. *Histochemistry.* 1984;80:569-573.

Kiviranta I; Tammi M; Jurvelin J; Saamanen AM; Heiminem JH. Moderate running exercise augments glycosaminoglycans and thickness of articular cartilage in the joint of young beagle dogs. *J Orthop Res.* 1988;6:188.

Kuettner KE; Aydelotte MB; Thonar EJMA. Articular matrix and structure: a minireview. *J. Rheum.* 1995;38:2:173-83.

Lange AK, Vanwanseele B, Singh MAF. Strength Training for Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A Systematic Review Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research). 2008;59:1488-1494.

Leanne S; Caroline F; Shona B. Sports participation, sports injury and osteoarthritis. Sports Med. 1999;28:2:123-135.

Leroux MA; Cheung HS; Bau JL. Altered mechanism and histomorphometry of canine tibial cartilage following joint immobilization. Osteoarthritis Cartilage. 2001;9:633-640.

Loeser RF. Aging and the etiopathogenesis and treatment of osteoarthritis. Rheum Dis Clin North. 2000;26:3:547-567.

Madden VJ; Henson MM. Rapid decalcification of temporal bones with preservation of ultrastructure. Hearing Res. 1997;111:76-84.

Maffulli N; King JB. Effects of physical activity on some components of skeletal system. Sports Med. 1999;28:2:123-135.

Martel-Pelletier J; Boileau C; Pelletier JP; Roughley PJ. Cartilage In normal and osteoarthritis Conditions Best Practice & Research Clinical Rheumatology. 2008;22:351-384.

Matyas JR; Huang D; Chung M; Adams ME. Regional quantification of cartilage type II collagen and aggrecan messenger RNA in joints with early experimental osteoarthritis. Arthritis Rheum. 2002;46:6:1536-1543.

Michalany J. Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para o cirurgião, enfermeiro e citotécnico. E.P.U. 1980, São Paulo.

70. Michelacci YM. Glicosaminoglicanos, proteoglicanos e mucopolissacarídeos bacterianos – Tese (Livro Docência) Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, Departamento de Bioquímica da Disciplina de Biologia Celular, 1996.

Moriyama H; Yoshimura O; Kawamata S; Takayanagi K; Kurise T; Kubota A; Hosoda M; Tobimatsu Y. Alteration in articular cartilage of rat knee joints after spinal cord injury. Osteoarthritis and Cartilage. 2008;16:3:392-398.

Muller FJ; Setton LA; Manicourt. Centrifugal and biomechanical comparison of proteoglycan aggregates from articular cartilage in experimental joint disuse and joint instability. J Orthop Res. 1994;12:498-508.

Narmodeva DA; Cheung HS; Wang JY. Altered swelling behavior of femoral cartilage

following joint immobilization in a canine model. J. Orthop. Res. 2002:83-91.

Nahas MV. Atividade física, saúde e qualidade de vida: Conceitos e sugestões para um estilo de vida ativo. Londrina: Midiograf. 2001.

Nishimura T, Hattori A, Takahashi K. Arrangement and identification of proteoglycans in basement membrane and intramuscular connective tissue of bovine semitendinosus muscle. Acta Anat. 1996;155:257-65.

Neeru G; Madhur G. Computerized Morphometric analysis of Human Femoral Articular Cartilage. Rheumatology. 2012: 2012:360201.

Norkim CC; Levangie PK. Articulações- Estrutura e função. 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.

O' Connor KM. Unweighting accelerates tidemark advancement in articular cartilage at the knee joint of rats. Journal of Bone and Mineral Research. 1997. 12:580-589.

Odgren PR; KIM N; Van Wesenbeeck LDGREN PR, KIM N, van Wesenbeeck L. Evidence that the rat osteopetrotic mutation toothless is not the TNFSF11 (Trans, Rankl, ODF, OPGL) gene. Int Dev Biol. 2001;45:853-9.

Otterness IG; Eskra JD; Bliven ML; Shay AK; Pelletier JP; Milici AJ. Exercise protects against articular cartilage degeneration in the hamster. Arthritis Rheum. 1998;41:11:2068-2076.

Palmoski MJ; Brandt KD. Running inhibits the reversal of atrophic changes in canine knee cartilage after removal of a leg cast. Arthritis Rheum. 1981;24:11:1329-1337.

Palmoski MJ; Colyer RA; Brandt KD. Joint motion in the absence of normal loading does not maintain normal cartilage. Arthritis Rheum. 1980;23:325-34.

Pap G; Eberhard T; Sturmer I; Machner A; Schwartzberg H; Roessner A; Neumann W. Development of osteoarthritis in the knee joints of wistar rats after strenuous running exercise in a running wheel by intracranial self-stimulation. Path Res Pract. 1998;194:41-47.

Patridge REH; Duthoe JJR. Controlled trial of the effect of complete immobilization of the joint in rheumatoids arthritis. Ann Rheum Dis. 1983;22:91-99.

Paukkonem K; Jurvelin J; Helminen HJ. Effect of immobilization on the articular cartilage in young rabbits. A quantitative light microscopic stereological study. Clin Orthop

Relat Res. 1986:206:270-280.

Petrella RJ; Bartha C. Home based exercise therapy for older persons with knee osteoarthritis: a randomized clinical trial. J Rheumatol. 2000:27:2215-2221.

Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S. Composition and structure of articular cartilage – a template for tissue repair. Clin Orthop Rel Res. 2001:391:S26-S33.

Refior HJ; Hubner G. On the morphology of the hyaline cartilage under immobilization and remobilization. Archives of orthopedic and traumatic surgery. 1978:91:4:305-314.

Rezende MU; Hernandez AJ; Camanho GL; Amatuzzi MM. Cartilagem articular e osteoartrose. Acta Ortop Bras. 2000:8:100-4.

Roy S. Ultrastructure of articular cartilage in experimental immobilization. Ann. Rheum. Dis. 1970:29:634-642.

Roughley PJ. Articular cartilage and changes in arthritis noncollagenous proteins and proteoglycans in the extracellular matrix of cartilage. Arthritis Res. 2001:3:342-347.

Rooij PP; Siebrecht MAN; Tagil M; Aspenberg P. The fate of mechanically induced cartilage in unload environment. J Biomech. 2001:34:961-966.

Saamanem AM; Tammi AM; Kiviranta I. Maturation of proteoglycan matrix in articular cartilage under increased and decreased joint loading. A study in young rabbits. Connect tissue Res. 1987:16:163-175.

Saamamen A; Kiviranta I; Jurvelin J; Helminen HJ; Tammi. Proteoglycan and collagen alterations in canine knee articular cartilage following 20 km daily running exercise for 15 weeks. Conn Tis Res. 1994:30:191-201.

Salvatore CA; Schreider. Pesquisas cariométricas no ciclo estral e gravídico. Mem. Int. Butantã. 1947:20:39-78.

Silva GJJ; Brum PC; Negrão CE; Krieger EM. Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensives. Hypertension. 1997:30:3:714-719.

Smith RL; Trindade MCD; Ikenou T; Mohtai M; Carter DR; Goodman SB; Schurman DJ. Effects of shear stress on articular chondrocyte metabolism. Biorheology. 2000:37:95-107.

Stevens A, Lowe J. Tecido conjuntivo, In: Stevens A, Lowe J. Human Histology, p.49-

64, 2a ed., USA: Morby, 1997.

Thaxter TH; Mann RA; Anderson CE. Degeneration of immobilized knee joints in rats. *Journal Bone Joint Surg.* 1965;47:567-85.

Thorstensson CA; Roos EM; Petersson IF; Ekdahl C. Six-week high-intensity exercise program for middle-aged patients with knee osteoarthritis: a randomized controlled trial. *BMC Musculoskeletal Disorders.* 2005;6:27-32.

Tomita H; Wada I; Sugimura E; Sakuma E; Mabuchi Y; Matsui N. Effect of joint immobilization on postnatal development of chondrocytes in rats knee joints. *Nagoya Med J.* 2002;45:3:89-103.

Trattning S. Overuse of hyaline cartilage and imaging. *Europ Journal Radiol.* 1997;25:188-198.

Trudel G; Himori K; Uhthoff HK. Contrasting alterations of apposed and unopposed articular cartilage during joint contracture formation. *Arch Phys Med Rehabil.* 2005;86:90-97.

Tuffery A. Laboratory animals. An introduction for experiments. 2.ed. John Wiley & Sons Ltd, 1995.

Usuba M; Akai M; Shirasaki Y. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on viscoelasticity of the contracted knee joint: comparison with whirlpool treatment in rats. *Laser Surg Med.* 1998;22:81-85.

Vasan. Effects of physical stress on the synthesis and degradation of cartilage matrix. *Conn Tis Res.* 1983;12:49-58.

Vanwanseele B; Lucchinetti E; Stussi E. The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions. *OsteoArthritis Cartilage.* 2002;10:408-419.

Van Den Hoogen BM; Van de Lest CHA; Van Weeren PR; Lafeber FPJG; Lopes-cardozo M; Van Golde LMG, Barneveld A. Loading-induced changes in synovial affect cartilage metabolism. *British Journal Rheum.* 1998;37:671-676.

Videman T; Eronen I; Candolin T. Proline incorporation and hydroxyproline concentration in articular cartilage during the development of osteoarthritis caused by immobilization. A study in vivo with rabbits. *Biomechem Journal.* 1981;200:435-440.

Wulfsohn D; Nyengaard JR; Tang Y. Postnatal growth of cardiomyocytes in the left ventricle of the rat. *The Anatomical Record Part. A*. 2004;277:236-247.

Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson A, Altman RD, Arden N, Bierma- zeinstra S. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines *Osteoarthritis and Cartilage*. 2001;16:137-162.